

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**INFLUENCIA DEL RECEPTOR DE HORMONAS  
TIROIDEAS EN DAÑO GENÓMICO Y SENESCENCIA  
CELULAR**

**TESIS DOCTORAL**  
**VERÓNICA GARCÍA CARPIZO**  
Madrid 2012

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**INFLUENCIA DEL RECEPTOR DE HORMONAS  
TIROIDEAS EN DAÑO GENÓMICO Y SENESCENCIA  
CELULAR**

Memoria presentada por VERÓNICA GARCÍA CARPIZO.

Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctor por la  
Universidad Autónoma de Madrid.

Director de Tesis: Dra. Ana María Aranda Iriarte y Dr. Alberto  
Zambrano Duarte

Tutor: Margarita Fernández Martín

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”,  
CSIC-UAM

Madrid, 2012

Ana María Aranda Iriarte, Doctora en Ciencias y profesora de Investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas del CSIC, y Alberto Zambrano Duarte, Doctor en Ciencias Biológicas

CERTIFICAN QUE: Verónica García Carpizo, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado:

**INFLUENCIA DEL RECEPTOR DE HORMONAS  
TIROIDEAS EN DAÑO GENÓMICO Y SENESCENCIA  
CELULAR**

El cual consideramos satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, expedimos el presente certificado en Madrid a 10 de Septiembre de 2012.

Fdo. Ana María Aranda Iriarte

Fdo. Alberto Zambrano Duarte

Profesora honoraria de la UAM

Investigador Contratado del CSIC



## **Agradecimientos**





## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería agradecer a la Dra. Ana Aranda el brindarme la posibilidad no solo de incorporarme a su grupo de investigación, sino también, de ofrecerme la oportunidad de implicarme en este proyecto además por su dirección, apoyo, confianza y continuas enseñanzas durante estos cuatro años.

También le quería agradecer al Dr. Alberto Zambrano la posibilidad tan grande que me brindó al permitirme participar en el proyecto y por su dirección.

A continuación, quería dar las gracias a nuestros colaboradores, es decir, a los “respirómetros”. Me refiero al grupo del Dr. Rafael Garesse y más concretamente a Esther y a Cristina porque sin ellos este trabajo estaría incompleto. Gracias por vuestro tiempo y también por vuestra implicación y dedicación, por intentar acercarnos un mundo tan alejado a nosotros, la respiración y la mitocondria, ese orgánulo para mí tan desconocido. Esther nunca olvidaré nuestras conversaciones en las que no te cansabas de repetirme lo mismo una y otra vez.

Ahora les toca el turno a mis compañeros de lab. Quería dar las gracias a Lidia, Rosa y Elvira porque de todas las situaciones se aprende y se saca algo positivo. A Olaia, que aunque no hayamos coincidido mucho, siempre que he tenido alguna consulta ha estado ahí; gracias por preguntar. También quería dar las gracias a Anita por su apoyo y a los que durante dos años fueron compañeros de lab, *Borja's team*. Mención especial deben de tener Ana Rosa y Ángeles, por escucharme y ayudarme a buscar la parte positiva cuando no la encontraba. Con vosotras he aprendido que lo difícil se puede hacer fácil. Gracias a Ángel por alegrarme todas las mañanas y también a Kenny por entrar de forma tan sigilosa, aunque creo que gracias a él he empezado a peinar canas, ahh!!, y por el chewbacca de mi cumple. Les toca a mis chicas, a Mila y a Constanza. Les quería agradecer las charletas disuasorias sobre cocina, depilación, masajes, ropa,..., para que luego la gente se piense que en el ámbito científico solo llevamos bata blanca, gafas de pasta y protectores de bolsillo. También os tengo que agradecer vuestro apoyo en el amplio significado de la palabra, con vosotras he aprendido mucho, además de lo importante que es el desayuno. Ahora es el turno de la única representación del género masculino que tenemos en el lab, Alberto. Uff! Es muy difícil intentar plasmar lo que para mí él significa y por todo lo que tengo que darle las gracias. Gracias a ti he aprendido a amar la Ciencia y a entenderla, incluso en esos días que vuelves a casa tan desmoralizado. También por enseñarme todo lo que sé e implicarte tanto en que tuviese una formación completa. SIMPLEMENTE MUCHAS GRACIAS.

Tampoco me quería olvidar de aquellos que durante un periodo de tiempo aunque fuera corto, formaron parte de mi vida. Al grupo del Dr. Antonio Cuadrado, en especial a Pat, Nadia y

Ana, por su apoyo en los comienzos que fueron difíciles y por hacer mucho más dulce la estancia, y no solo por los *snickers*. Gracias por ayudarme a tomar una decisión importante en el momento adecuado; quizás sin vosotras este presente no hubiese sido posible. También quería dar las gracias al grupo de la Dra. Amelia Nieto por enseñarme como es la vida real de un laboratorio y además por permitirme ser partícipe en todo momento. Quiero recordar a los chicos del CNIO del grupo del Dr. Esteller, que me acogieron y me prestaron toda su ayuda; en especial al Dr. Mario Fraga, Vincenzo y Esther por vuestro apoyo y ayuda.

Ahora agradecerles a todas esas personas del IIB que han hecho mi estancia mucho más agradable aquí, como son Asun (siento haber sido tan pesada, ya sabes, la burocracia...), Laura, María, Laura, Yuri, Raúl, Pepa, Toño, Fabio, Eva, Rafa, ... por las risas y los apoyos.

No me quería tampoco olvidar de mis compis de la UAM, Anitas varias (Ana Sastre, Ana Gómez y Ana Marín), Patri y Abel. Gracias al *power D* hemos combatido al vil villano y ya estamos en otras fase!!!

Ahora espero no emocionarme y empezar a llorar como una magdalena... Gracias a mis padres por ser siempre tan generosos y por alentarme para hacer realidad mis sueños. Sin vosotros seguro que este momento nunca hubiese llegado. También gracias a mis hermanos, Patri y Guillermo, por vuestro apoyo diario y constante. Mil gracias a mis abuelos, aunque dos de ellos no podrán leerlo, por hacerme sentir tan sumamente especial. A mis tíos y primos por su apoyo incondicional, y muy especialmente a mi tía Blanca, tu marcha me dejó un gran vacío, pero nunca olvidaré todo lo que hiciste por mí. Por tus largas llamadas de teléfono en los momentos más importantes para que no me sintiese sola. También quiero acordarme de la recién llegada, Suriñe, porque mirar tu carita tan dulce me da fuerzas para todo.

Un apartado especial merecen todas esas personas que de manera incansable se han preocupado por mí. Sí, me refiero a Bea, Sonia, Dani, Esther y José, sin vosotros y las cenas no hubiese tenido energía suficiente; mil gracias. A todos mis amigos de la infancia, que aunque solo nos veamos en verano en la piscina, es imposible poder olvidar todo lo vivido y sobre todo cuando soñábamos con ser "mayores". Por suerte, como podéis leer, a mí parte se me ha hecho realidad. Si, si, ... que ya llegado vuestro momento. Sí, me refiero a mis amigas del barrio, que aunque muchas ya habéis cruzado las fronteras y hayamos cambiado el sitio de quedar de Cris B a el cañeo, sé que entre nosotras pocas cosas más han cambiado. Gracias Esther por estar a mi lado desde antes de empezar la guardería. Gracias a Crisi por intentar entender un mundo tan alejado a ella. A Leti gracias por ayudarme a buscar mi momento zen. Mil gracias también a Pepa, Irene, Patri, Lucía, Jordana y Amaia aunque me pusisteis el listón tal alto nunca podré olvidar entre muchas cosas nuestras vacaciones en la playa.

Ahora es el turno de Fernando, mi *neng*, mil gracias de todo corazón por ser mi gran apoyo. Sabes que hemos vivido toda clase de momentos y siempre has estado ahí. Gracias por buscarme la sonrisa incluso cuando todo indicaba que era imposible. También gracias por tu compañía cuando venías conmigo al lab o te tocaba esperarme cuando te decía que solo me quedaba un momentito. Gracias por hacer el esfuerzo de intentar comprenderme en todo momento. GRACIAS.

Espero no haberme olvidado de nadie, y si lo he hecho, espero que se sienta incluido en este muchas gracias a todos aquellos que en algún momento se han cruzado nuestros caminos. Porque aunque no lo crean han dejado marca.

MIL GRACIAS A TODOS. HA SIDO UN VERDADERO PLACER.



**Resumen**



## RESUMEN

Las hormonas tiroideas (THs) regulan, entre otros procesos fisiológicos, el metabolismo, desarrollo, crecimiento y proliferación celular en organismos superiores. Estas acciones las realizan principalmente a través de su unión a los receptores de hormonas tiroideas (THRs) que son factores de transcripción dependientes de ligando, pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares (NRs). Uno de estos receptores, el THRB (THR $\beta$ 1), se comporta como un gen supresor de tumores ya que es capaz de reducir la proliferación de algunos tipos de células cancerosas y de inhibir la transformación celular y el crecimiento de tumores *in vivo*. Además, la aparición de mutaciones y la pérdida de expresión de THRB es un hecho común en varios tipos de tumores.

Por otra parte, se ha descrito que otros ligandos de los NRs como el ácido retinoico o los andrógenos pueden inducir senescencia celular. Este fenómeno es muy importante como supresor tumoral y supone una de las primeras barreras contra la transformación celular y la progression tumoral. Con estos antecedentes, nos planteamos la hipótesis de que parte de la actividad antitumoral del THR podría estar mediada por la inducción de senescencia celular.

Los resultados obtenidos en cultivos de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), indican que el tratamiento prolongado con T3 y la sobreexpresión de THRB inducen parada proliferativa, la aparición de células senescentes y daño en el ADN. La aparición de daño genómico también se observa en el hígado y riñón de ratones hipertiroideos. El daño observado tiene un origen oxidativo debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como consecuencia de alteraciones en la actividad mitocondrial. Los efectos sobre la mitocondria parecen tener lugar a través de la ruta de señalización de ATM/PRKAA y conducen a la activación del factor respiratorio nuclear 1 (NRF1) y a su reclutamiento a promotores de genes importantes para la función mitocondrial. ATM parece esencial para la inhibición de proliferación mediada por la hormona T3 y THRB, la aparición de ROS y senescencia celular, y además parece funcionar como un coactivador para THRB.

Estas nuevas acciones del THRB en daño genómico y senescencia celular pueden ser en parte responsables de su actividad supresora tumoral observada *in vivo* y de la aparición de daño tisular asociado a la condición hipertiroidea.





## ABSTRACT

Thyroid hormones (THs) regulate, among other physiological processes, metabolism, development, growth and proliferation in higher eukaryotes. These actions take place through their interaction with thyroid hormone receptors (THRs) that belong to the superfamily of nuclear receptors (NRs), which act as ligand-dependent transcription factors. One of the THR isoforms, THRB (THR $\beta$ 1) acts as a tumor suppressor, as it reduces cellular proliferation of some cancer cell types and is able to inhibit cellular transformation and growth and dissemination of some tumors *in vivo*. Moreover, the occurrence of mutations and loss of expression of THRB is a common event in some tumors.

On the other hand, it has been described that other ligands of NRs, such as retinoic acid or androgens can induce cellular senescence. This is a very important phenomenon, since cellular senescence has been considered as a tumor suppressor mechanism and represents one of the first barriers against cellular transformation and tumor progression. This background led us to test the hypothesis that part of the tumor suppressor activity of the receptor may be, in part, mediated by the induction of cellular senescence.

The results obtained show that prolonged treatment with T3 and THRB overexpression induces cell arrest, senescence and DNA damage in cultures of mouse embryonic fibroblasts (MEFs). The appearance of genomic damage is also observed in liver and kidney of hyperthyroid mice. This genomic damage has an oxidative origin, and is secondary to the generation of reactive oxygen species (ROS), as a consequence of alterations of the normal mitochondrial activity. These effects on mitochondrial function are mediated by the ATM/PRKAA signal transduction pathway and lead to the expression and activation of at least the nuclear respiratory factor 1 (NRF1) and to its recruitment to the promoters of genes with a key role on mitochondrial function. ATM appears to be required for the inhibition of proliferation mediated by the hormone and THRB, the production of ROS and the occurrence of cellular senescence. In addition, it also seems to act as a transcriptional coactivator for THRB.

Taken together, these novel effects of the hormone T3 and THRB on DNA damage and cellular senescence may be involved in the tumor suppressor activity of THRB observed *in vivo*, and in the occurrence of tissue damage associated to the hyperthyroid condition.



## Índice



## ÍNDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS .....	1
-----------------------------	---

INTRODUCCIÓN .....	11
--------------------	----

1.- Las hormonas tiroideas .....	13
2.- Los receptores de las hormonas tiroideas (THR).....	13
2.1.- <i>Los genes de los THR y la expresión de las distintas isoformas</i> .....	13
2.2.- <i>Función fisiológica de los THR</i> .....	14
2.3.- <i>Estructura de los THR</i> .....	15
3.- Regulación de la expresión génica por los THR .....	16
3.1.- <i>Elementos de respuesta a hormona</i> .....	16
3.2.- <i>Mecanismos de regulación de la expresión génica por los THR</i> .....	17
3.2.1.- <i>Activación transcripcional mediada por TREs positivos</i> .....	17
3.2.2.- <i>Represión transcripcional mediada por TREs negativos</i> .....	18
3.2.3.- <i>Mecanismos independientes de la unión a TREs</i> .....	18
4.- El papel de los THRS en cáncer .....	19
5.- Efecto de las hormonas tiroideas en la función mitocondrial .....	21
6.- Especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo.....	23
6.1.- <i>Las especies reactivas de oxígeno (ROS)</i> .....	23
6.2.- <i>La función de las ROS en los sistemas biológicos y sus efectos</i> .....	23
6.3.- <i>El origen de las ROS en la células y su eliminación</i> .....	23
6.4.- <i>Efecto de las hormonas tiroideas en la producción y eliminación de ROS</i> .....	24
7.- Respuesta celular al daño genómico y su reparación.....	24
7.1.- <i>Generalidades sobre la respuesta celular al daño genómico y su reparación</i> .....	24
7.2.- <i>Relación entre la actividad de los receptores nucleares (NRs) y el daño genómico</i> .....	27
7.3.- <i>Daño genómico y biogénesis mitocondrial. Papel de ATM</i> .....	28
8.- Senescencia celular .....	29
8.1.- <i>Definición y características</i> .....	29
8.2.- <i>Tipos de senescencia celular e inductores</i> .....	30
8.3.- <i>La senescencia celular como mecanismo supresor tumoral</i> .....	31
8.4.- <i>Receptores nucleares y senescencia celular</i> .....	32

OBJETIVOS .....	33
-----------------	----

## MATERIALES Y MÉTODOS..... 37

1.- Líneas celulares .....	39
2.- Reactivos, <i>kits</i> y anticuerpos.....	39
3.- Plásmidos y transfecciones.....	47
3.1.- <i>Transfecciones estables</i> .....	47
3.2.- <i>Transfecciones transitorias</i> .....	48
3.3.- <i>Plásmidos</i> .....	48
4.- <i>Western-blotting</i> (Inmunotransferencia) .....	50
5.- Inmunofluorescencia indirecta de células .....	51
6.- detección de roturas físicas en el ADN .....	52
7.- Extracción de ARN y RT-qPCR en tiempo real .....	52
8.- Evaluación de la proliferación celular. Cálculo de PDLs .....	54
9.- Ensayo de la actividad $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ gal).....	55
10.- Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) .....	55
11.- Irradiación de células con rayos $\gamma$ .....	57
12.- Medición de las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	57
13.- Medición de glutatión oxidada (GSSG) en extractos celulares .....	58
14.- Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	58
15.- Medida de la capacidad respiratoria celular.....	58
16.- Experimentos con animales .....	59

17.- Inmunohistoquímica .....	59
18.- Análisis estadístico .....	60

## RESULTADOS..... 61

1.- Influencia de la hormona T3 y de la expresión del receptor THRB en senescencia celular .....	63
1.1.- Efecto de la hormona T3 y del receptor THRB en la proliferación y senescencia de MEFs en cultivos primarios .....	63
1.1.1.- Comparación entre los efectos de THRB y RAS <sup>Val12</sup> . Análisis de la aparición de focos de daño al ADN .....	65
1.2.- Efecto de la hormona T3 y del receptor THRB en la proliferación y senescencia celular de MEFs THRB <sup>A(-/-)B(-/-)</sup> inmortalizados. Influencia de las principales isoformas del THRB .....	68
1.3.- Efecto de diferentes mutantes del receptor THRB en la proliferación y senescencia de MEFs THRB <sup>A(-/-)B(-/-)</sup> .....	69
1.4.- Efecto de la hormona T3 y del receptor THRB en la proliferación y senescencia celular de MEFs Tp53 <sup>(-/-)</sup> .....	71
2.- Influencia de la hormona T3 y de la expresión del receptor THRB en daño genómico .....	73
2.1.- El tratamiento con hormona T3 y la sobreexpresión del receptor THRB inducen la aparición de focos de daño al ADN .....	73
2.2.- El tratamiento con hormona T3 y la sobreexpresión del receptor THRB inducen roturas físicas en el ADN .....	75
2.3.- Influencia de la expresión de THRB y del tratamiento con T3 en la capacidad reparadora celular del daño genómico .....	77
2.4.- El tratamiento con T3 y la sobreexpresión del receptor THRB no inducen daño replicativo .....	79
2.5.- Efecto de la T3 y de la expresión de THRB en MEFs deficientes en ATM (ATMKO) .....	82
2.6.- Análisis del daño oxidativo y de las especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	86
2.7.- El tratamiento con T3 induce daño genómico in vivo .....	93
3.- Origen del daño inducido por T3 y la expresión de THRB: efectos en la función mitocondrial .....	96
3.1.- El tratamiento con T3 induce la expresión temprana de genes importantes para la función mitocondrial y un aumento en el consumo de oxígeno .....	96
3.2.- Regulación transcripcional de la mitocondria: efectos de la T3 en la expresión de factores de transcripción. Expresión de sistemas detoxificantes .....	101
3.2.1.- El tratamiento con T3 aumenta los niveles de NRF1 y la activación de PRKAA en MEFs TP53KO .....	103
3.2.2.- la hormona T3 induce el reclutamiento de NRF1 a promotores de genes importantes para la función mitocondrial .....	108



<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>111</b>
1.- El THRB induce senecencia en mefs normales y deficientes en TP53 .....	113
2.- El THRB no induce senescencia en MEFs deficientes en ATM.....	115
3.- El THRB induce DSBs.....	116
4.- La formación de DSBs es consecuencia de daño oxidativo secundario a la generación de ROS mitocondriales.....	117
5.- La T3 y el THRB aumentan la expresión de genes mitocondriales y el consumo de oxígeno en MEFs .....	119
6.- El hipertiroidismo causa daño al ADN en tejidos de ratón <i>in vivo</i> .....	123
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>125</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>129</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>153</b>

## **Clave de abreviaturas**



•**O<sub>2</sub><sup>-</sup>**: anión superóxido.

•**OH**: radical hidroxilo.

**293T**: células HEK293 (*human embryonic kidney*). Células epiteliales de riñón embrionarias), ATCC CRL-11268, a las que se les ha insertado el antígeno T de SV40 (virus vacuolizante del Simio).

**8-OH-dG**: 8-hidroxy deoxyguanosina.

**Acetil**: acetilación.

**ADN**: ácido desoxirribonucleico.

**ADNc**: ácido desoxirribonucleico complementario.

**AP-1**: proteína activadora 1.

**AR**: receptor de andrógenos.

**ARF**: *ADP ribosylation factor*.

**ARN**: ácido ribonucleico.

**ARNm**: ácido ribonucleico mensajero.

**ARs**: receptores de andrógenos.

**ATCC**: colección de cultivos celulares tipo americana.

**ATM**: (*Ataxia Telangiectasia Mutated kinase*). Proteína quinasa cuyo gen está mutado en la enfermedad *Ataxia Telangiectasia*.

**ATMKO**: Fibroblastos embrionarios de ratón "knock-out" para el gen ATM.

**ATP**: adenosín trifosfato.

**ATR**: *ATM and Rad3-related protein*.

**BCA**: ácido bibinconínico.

**BER**: *base excision repair*.

**bp**: pares de bases.

**BrdU**: bromodeoxiuridina.

**BSA**: albúmina de suero bovina.

**Cat**: catalasa.

**CBP**: proteína de unión a CREB.

**CDKs**: quinasa dependiente de ciclina.

**ChIP**: Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (del inglés *chromatin immunoprecipitation*).

**CoR**: correpresor.

**Cox10**: proteína de ensamblaje del citocromo c oxidasa, hemo A: farnesiltransferasa.

**Cr**: una medida de la respiración celular "routine" que refleja la actividad metabólica en las condiciones de cultivo rutinarias.

**CrO**: la respiración tras inhibir con oligomicina que es causada principalmente por la compensación de la fuga de protones ("*proton leak*") tras la inhibición de la ATP sintasa.

**CrU**: la respiración estimulada un desacoplante que refleja la capacidad respiratoria de las mitocondrias desacopladas en células intactas.

**CTE**: cadena transportadora de electrones.

**D**: directo.

**DAB**: diaminobenzidina.

**DBD**: dominio de unión a ADN.

**DD foci**: *DNA damage foci*.

**DDR**: *DNA damage response*.

**Dio1**: desyodasa 1.

**DMEM**: medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco.

**DMSO**: dimetilsulfóxido.

**DNA-SCARS**: focos de DDR asociados a senescencia celular.

**DNAse I**: deoxirribonucleasa I.

**DRs**: repeticiones directas.

**DSB:** *double strands breaks*.

**dUTP:** deoxiuridín trifosfato.

**E2F:** factor de transcripción E2F.

**ECL:** *Enhanced chemiluminescence*.

**ELISA:** *Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*.

**ERRs:** receptores relacionados con los receptores de estrógenos.

**ERs:** receptores de estrógenos.

**FADH<sub>2</sub>:** forma reducida del dinucleótido de flavina-adenina (FAD).

**FCCP:** carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona.

**Fig.:** figura.

**FITC:** fluoresceína.

**Foci:** del latín, focos.

**gag:** proteína estructural de los retrovirus.

**Gapdh:** gen del ratón que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

**Gpx:** glutatión peroxidada.

**GRs:** receptores de glucocorticoides.

**GSH:** glutatión.

**GSSG:** disulfuro de glutatión.

**GST:** glutatión s transferasa.

**Gy:** gray.

**h.p.i.:** horas post-infección.

**h.p.t.:** horas post-transfección.

**H<sub>2</sub>DCFDA:** 2', 7' diclorofluoresceína diacetato.

**H3F3A K9 3me:** histona 3 trimetilada en lisina 9.

**HAT:** acetiltransferasa de histonas.

**HC-ADN:** heterocromatina.

**HDACs:** deacetilasas de histonas.

**HepG2:** células de carcino heptocelular humano, ATCC: HB-8065.

**HMTs:** metiltransferasas de histonas.

**HREs:** elementos de respuesta a hormona.

**hsp:** proteínas de *heat-shock*.

**HUGO:** *Human Genome Organization*.

**IF:** inmunofluorescencia.

**IgG:** inmunoglobulinas normales de la subclase G.

**IHC:** inmunohistoquímica.

**IMR90:** fibroblastos humanos diploides (ATCC: CCL-186).

**IPs:** palíndrome invertido.

**KO:** *knock-out*.

**LBD:** dominio de unión a ligando.

**LTRs:** *Long Terminal Repeats*.

**Luc:** Luciferasa.

**mAb:** anticuerpo monoclonal.

**MAPKs:** proteínas quinasas activadas por mitógenos.

**MCF-7:** células tumorales humanas de mama, ATCC HTB-22.

**MCS:** sitio de multiclonaje.

**MEFs:** fibroblastos embrionarios de ratón, *Mouse Embryonic Fibroblasts*.

**MES:** ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico.

**mg:** miligramo.

**min:** minuto.

**ml:** mililitro.

**MMEJ:** *micro homology-mediated end joining*.

**MMR:** *mismatch repair*.

**MPA:** ácido metafosfórico.

**MW:** *multiwell*.

**N2aβ:** células de neuroblastoma (ATCC: CCL-131) de ratón transfectadas establemente con THRβ1.

**NAC:** N-acetil-cisteína.

**NAD<sup>+</sup>:** dinucleótido de nicotinamina adenina.

**NADH:** forma reducida del NAD<sup>+</sup>.

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*.

**NCoR:** correpresor nuclear.

**NHEJ:** *non-homologous end joining*.

**NER:** *nucleotide escisión repair*.  
**nm:** nanómetro.

**NIH-3T3:** fibroblastos murinos, ATCC: CRL-1658.

**NP-40:** nonil fenoxipolietoxiletanol.

**NRF1:** factor de respiración nuclear 1, *Nuclear Respiratory Factor*.

**NRs:** receptores nucleares.

**ns:** estadísticamente no significativo.

**O<sub>2</sub>:** oxígeno molecular.

**°C:** grados centígrados.

**OGG1:** glicosilasa ADN 8-oxoguanosina.

**OIS:** *oncogene induced senescence*.

**ON:** *overnight*.

**ONOO<sup>-</sup>:** peroxinitrito.

**p.ej.:** por ejemplo.

**pAb:** anticuerpo policlonal.

**Pal:** palíndrome.

**PARP1:** *poly ADP-ribose polymerase*.

**PBS:** tampón fosfato salino pH 7,5.

**PBST:** tampón fosfato salino pH 7,5 con 0,05% de Tween-20.

**P<sub>CMV IE</sub>:** promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus.

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.

**PDLs:** *population doublings levels*,  
PDLs=log (N<sub>f</sub>/N<sub>i</sub>)\*log 2.

**PFA:** paraformaldehído.

**PGF2α:** prostaglandina 2α.

**PKA:** proteína quinasa A.

**pmol:** picomol.

**PMSF:** fenil-metil-sulfonil-fluoruro.

**pol:** transcriptasa reversa retroviral.

**R:** reverso.

**r.p.m.:** revoluciones por minuto.

**RA:** ácido retinoico.

**Rac1:** Gen murino que codifica para el sustrato de la toxina botulínica C3 relacionada con RAS.

**RARs:** receptores del ácido retinoico.

**RB1:** retinoblastoma.

**RCR:** *Respiratory Control Ratio*.

**RCRp:** *Phosphorylation Respiratory Control Ratio*.

**RNAse A:** ribonucleasa A.

**RNS:** especies reactivas de nitrógeno.

**ROS:** especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*).

**ROX:** Respiración después de la inhibición secuencial del complejo I y III mediante la incorporación al medio de rotenona, primero, y antimicina A después.

**RT-qPCR:** RT-PCR cuantitativa.

**RT:** temperatura ambiente.

**RXR:** receptor X de retinoides.

**s:** segundo.

**s.d.:** desviación estándar.

**SA- $\beta$ -Gal:** actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia.

**SAHF:** focos de heterocromatina asociados a senescencia celular.

**SASP:** fenotipo secretor asociado a células senescentes.

**Sco1:** gen del ratón que codifica para el factor de ensamblaje de la citocromo oxidasa.

**SDS-PAGE:** electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

**SDS:** dodecil sulfato sódico.

**Ser:** aminoácido serina.

**SFB:** suero fetal bovino.

**SIPS:** senescencia inducida por estrés.

**SOD:** superóxido dismutasa.

**Sod1:** gen del ratón que codifica para la superóxido dismutasa 1.

**Sod2:** gen del ratón que codifica para la superóxido dismutasa 2.

**SSB:** *single strands breaks*.

**T3:** hormona triiodotironina.

**T4:** hormona tiroxina.

**TAE:** solución de Tris base, ácido acético y EDTA, pH 8,0.

**TBP:** *TATA box binding protein*.

**TdT:** terminal deoxiribonucleótido transferasa.

**TEAM:** trietanoalamina.

**Tfam:** gen murino que codifica para el factor de transcripción A mitocondrial.

**TGFB:** *tumor growth factor  $\beta$* .

**THR:** receptores de las hormonas tiroideas.

**TK:** timidina quinasa.

**TP53KO:** fibroblastos embrionarios de ratón *knock-out* para el gen *Tp53*.

**TPA:** *tissue polypeptide antigen*.

**TPDQ:** 1,2,3,4-tetrahydro-2,2-dimethyl-6-(trifluoromethyl)-8-pyridono-[5,6-g]quinoline.

**TRE:** elemento de respuesta a hormona tiroidea.

**TRE<sub>pal</sub>:** hemisitios TRE palindrómicos.

**Tris:** tris(hidroximetil)aminometano.

**Trx:** tioredoxinas.

**TR $\alpha\beta$ KO:** Fibroblastos embrionarios de ratón "knock-out" para los genes que codifican para los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de la hormona tiroidea.

**TSH:** *thyroid-stimulating hormone*, también conocida como tirotrópina.

**u.a.:** unidades arbitrarias.

**Ucp2:** gen del ratón que codifica para la proteína desacoplante 2.

**Ucp3:** gen del ratón que codifica para la proteína desacoplante 3.

**UCPs:** proteínas desacoplantes.

**UCR:** *Uncoupling Control Ratio*.

**UV:** ultravioleta.

**v-erb-a:** oncogén del virus de la eritroblastosis aviar.

**Val:** aminoácido valina.

**VDR:** receptor de vitamina D.

**WB:** *western blot*.

**wt:** *wild type* (fenotipo normal).

**Xgal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-3galactopiranosido.

**$\mu$ g:** microgramo.

**$\mu$ M:** micromolar.



## Clave de abreviaturas

En la siguiente tabla se muestra la nomenclatura de los genes y proteínas empleada en esta memoria:

Nomenclatura HUGO	Nomenclatura clásica	Breve Descripción
ACTB	$\beta$ -actina	Proteína globular de los microfilamentos
CBX3	$\gamma$ HP1	Proteína de unión a heterocromatina 1 $\gamma$
CCNA1	CICLINA A1	Se une a CDK2, específico de la fase S
CCND1	CICLINA D1	Se une a CDK4/6. Regula la transición G1/S
CCNE	CICLINA E	Se une a CDK2, específico de la fase G1/S
CDKN1A	P21	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A (CDK2/4)
CDKN2A	P16	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A (CDK4)
CDKN2C	P18	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2C (CDK4)
CDKN2D	P19/ARF	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2D (CDK4)
CHEK1	CHK1	Quinasa <i>checkpoint</i> 1
CHEK2	CHK2	Quinasa <i>checkpoint</i> 2
CREBBP	CBP	Proteína de unión a CREB
CTTNB1	$\beta$ -catenina	Proteína de adhesión celular
CYBB	NOX2	Citocromo c-245
ERBB3	ErbB3	Receptor tirosina proteína quinasa erb3
GTF2B	TFIIB	Factor general de transcripción IIBs
H2AFX	H2AX	Histona 2AX
H3F3A	H3	Histona 3
HDM2	MDM2	TP53 E3 ubiquitín proteína ligasa
MET	C-met	Receptor del factor de crecimiento de hepatocito
MT-CO1	COX1	Citocromo oxidasa 1 codificada en la mitocondria
MT-CYB	CYTB	Citocromo b codificada en la mitocondria
NBN	NBS1	Componente del complejo mediador MRN
NCoA1	SRC-1	Coactivador de los NRs
NCoA2	GRIP-1/TIF-2	Coactivador de los NRs
NCoA3	ACTR	Coactivador de los NRs
NCoR2	SMRT	<i>Silencing modulator of RAR and TR</i>
P300	EP300	Histona acetiltransferasa P300

PIK3CA	PI3K	Quinasa dependiente de fosfatidil 3-OH-inositol, polipéptido $\alpha$ , subunidad catalítica
PIK3R	P85	Subunidad reguladora de PIK3CA
PKKDC	DNA-PK	Proteína quinasa dependiente de ADN
PPARGC1A	PGC1 $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
PPARGC1B	PGC1 $\beta$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta.</i>
PRKAA	AMPK	Proteín quinasa activada por AMP
SLC25A4	ANT1	Translocador de nucleótido de adenina en la mitocondria
SMARCA1	SWI/SNF	Complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP
SMARCA4	BRG1/Brahma	Subfamilia a miembro 4 de reguladores de cromatina dependiente de actina
STK11	LKB1	Serín/ treonín quinasa 11
TAF5L	p/CAF	Factor asociado a P300/CBP
TGFB	TGF $\beta$	<i>Tumor growth factor <math>\beta</math></i>
THRA1	TR $\alpha$ 1	Receptor hormonas tiroideas $\alpha$ 1
THRB1	TR $\beta$ 1	Receptor hormonas tiroideas $\beta$ 1
TOP2B	TOPOII $\beta$	ADN topoisomerasa II $\beta$
TP53	P53	Proteína tumoral P53
TP53BP1	P53BP1	Proteína de unión a TP53
TRH	THR	Hormona liberadora de tirpotropina
TUBA1A	$\alpha$ -tubulina	Proteína globular de los microtúbulos
UQCRSF1	RIP1	Ubiquinol citocromo c reductasa, sulfuro de hierro Rieske 1
XCCC6	KU70	Proteína de reparación de ADN por recombinación no homóloga
XRCC5	KU86	Proteína de reparación de ADN por recombinación no homóloga



## Introducción

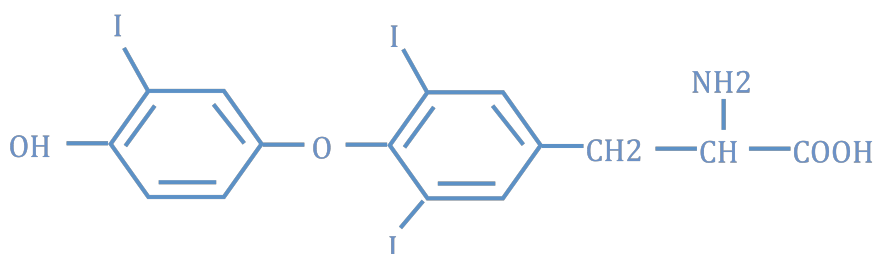


## 1.- Las Hormonas Tiroideas.

Las hormonas tiroideas son pequeñas moléculas lipofílicas, derivadas del aminoácido tirosina y producidas por la glándula tiroides. Las formas mayoritarias de estas hormonas son la T3 (3,3',5-triiodotironina) y la T4 (tiroxina), siendo la T4 la forma mayoritariamente segregada por el tiroides. La T4 tiene como principal función servir como precursor de T3, tras la desiodación 5' del anillo externo, mediada por las enzimas desiodasas (334). Existen tres tipos de desiodasas, siendo el grupo más importante las del tipo I (Dio1), que se expresan en los tejidos periféricos como hígado y riñón, y que convierten la T4 circulante en T3, la forma más activa (**Fig. 1a**) (208, 273, 334).

Las hormonas tiroideas tienen un papel fundamental en el crecimiento, diferenciación y metabolismo de los organismos superiores (140), y son necesarias para el correcto funcionamiento de la mayoría de los tejidos. Una de sus principales acciones es el aumento del consumo de oxígeno y del metabolismo basal (209). Afectan a la biosíntesis de proteínas, regulan el crecimiento, la función cardíaca, la maduración del sistema nervioso y son esenciales para el metabolismo de glúcidos y lípidos, influyendo en el metabolismo energético y la generación de calor.

### Triiodotironina (T3) (T3)



**Figura 1. La hormona T3.** Estructura química de la hormona triiodotironina (T3).

## 2.- Los Receptores de las Hormonas Tiroideas (THR).

### 2.1.- Los genes de los THR y la expresión de las distintas isoformas.

La acción de las hormonas tiroideas está mediada principalmente a través de su unión a los receptores de hormonas tiroideas (THR). Los THR están codificados por dos genes, *THRA* y *THRB*, localizados, en el caso de humanos, en los cromosomas 17 y 3, respectivamente. Estos genes dan lugar a las distintas isoformas de los receptores  $\text{THR}\alpha$  y  $\text{THR}\beta$  (147).

El gen *THRA* es el homólogo celular del oncogén v-erb-a, del virus de la eritroblastosis aviar, que codifica una proteína de fusión entre  $\text{THR}\alpha 1$  y el producto del gen retroviral *gag*, que ha perdido la capacidad de unir ligando. El gen *THRA* codifica para varias isoformas del receptor, siendo las principales  $\text{THR}\alpha 1$  y  $\text{THR}\alpha 2$ . Esta última variante no une ligando y se comporta como un dominante negativo de  $\text{THR}\alpha 1$  (78, 147).

El gen *THRB* da lugar a las isoformas  $\text{THR}\beta 1$  y  $\text{THR}\beta 2$ , que pueden unir T3 (118, 147). Otras variantes de  $\text{THR}\beta$  son las isoformas  $\text{THR}\beta 3$  y  $\text{THR}\Delta\beta 3$ . Esta última se comporta como un dominante negativo que une T3 con alta afinidad (320).

La expresión diferencial de estas isoformas en los tejidos constituye un importante nivel de regulación.  $\text{THR}\alpha 1$  presenta una expresión ubicua y se localiza principalmente en cerebro, músculo esquelético y cardíaco, tejido adiposo marrón e intestino (192, 227, 279), mientras que  $\text{THR}\alpha 2$  se expresa de forma mayoritaria en el cerebro (191, 192).  $\text{THR}\beta 1$  es la isoforma que tiene una distribución más generalizada en el organismo encontrándose altos niveles de expresión en cerebro, hígado y riñón (118), mientras que  $\text{THR}\beta 2$  se expresa exclusivamente en la glándula hipofisaria, hipotálamo y retina (54, 118, 147).

Los THR pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares (NRs), que actúan como factores de transcripción dependientes de ligando (10). Todos los miembros de esta superfamilia descienden, a través de un proceso evolutivo, de un ancestro común (10). Este mismo proceso evolutivo permite la división de los NRs en seis subfamilias (146). Los THR forman parte de la primera subclase, la más amplia, que además engloba a los receptores del ácido retinoico (RARs), de la vitamina D (VDR), los receptores de los activadores de la proliferación de peroxisomas (PPARs) y alguno de los receptores de los que no se conoce su ligando, los denominados receptores huérfanos (10, 92).

### 2.2.- Función fisiológica de los THR.

El estudio con animales transgénicos o que presentan inactivación génica, *knock-out* (KO), de alguna de las isoformas de los THR, ha permitido establecer las funciones fisiológicas de estos receptores.

Así, el transgénico para v-erb-a tiene un fenotipo que se caracteriza por presentar hipotiroidismo congénito, respuesta a TSH alterada, hepatomas, fertilidad disminuida y una reducción en la cantidad de tejido adiposo (14). También se ha observado que este fenotipo no se debe exclusivamente al bloqueo de la respuesta a la hormona T3, puesto que se ha observado también una actividad dominante negativa de v-erb-a sobre la activación transcripcional mediada por ácido retinoico (44, 63). La inactivación de  $\text{THR}\alpha 1$  conlleva a un

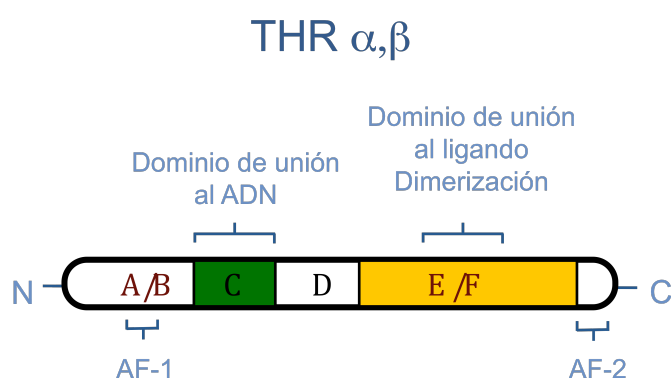
descenso en la temperatura corporal y a la alteración de la función cardíaca (319). La inactivación de  $THR\alpha 2$ , en cambio, se caracteriza por presentar únicamente ligeras anomalías (82). Sin embargo, si se inactivan ambas isoformas, los animales presentan un fenotipo de hipotiroidismo severo, malformaciones intestinales y retraso en el crecimiento y los ratones mueren después del periodo de lactancia (83). La incidencia de la mortalidad en estos animales disminuye parcialmente si a las crías se les inyecta T3.

El estudio de los ratones KO del gen *Thrb*, indica un papel muy importante de este receptor en el desarrollo del oído y de la retina, así como en el metabolismo del colesterol (81, 100, 203). El fenotipo que presenta el doble KO para *Thra* y *Thrb*, es bastante similar al del KO para *Thra*, además, las hembras son estériles y los machos presentan una menor fertilidad (96).

En resumen, todos estos estudios permiten concluir que la ausencia de los THR no es incompatible con la vida, y los ratones con hipotiroidismo congénito presentan defectos más graves que los que se observan en los ratones KO, debido probablemente al papel que el receptor vacío y los correpresores tienen en la represión de la transcripción basal de los genes diana de los receptores.

### 2.3.- Estructura de los THR.

Los THR, como la mayoría de los NRs, presentan una estructura modular compuesta por diferentes dominios (**Fig. 2**), los cuales son funcionalmente autónomos y además presentan la capacidad de ser intercambiables con los de otros NRs relacionados, sin perder su capacidad funcional (10).



**Figura 2. Receptor de las hormonas tiroideas (THR).** Estructura modular de los receptores de hormonas tiroideas (THR). La región A/B incluye el dominio de transactivación independiente de ligando AF-1; la región C incluye el dominio de unión al ADN (DBD). La región D es un dominio bisagra y la región E/F contiene los dominios de unión al ligando (LBD), de dimerización y de transactivación dependiente de ligando (AF-2).

El dominio A/B de los NRs es una región variable en longitud y secuencia que se localiza en el extremo amino-terminal y presenta un dominio AF-1. Este dominio tiene función de activación transcripcional independiente de ligando. Por diferentes procesos de procesamiento alternativo y por el uso de diferentes regiones promotoras y sitios de inicio de transcripción, se generan diferentes tipos de estos dominios, lo que al final da lugar a la



generación de diferentes isoformas. Por ejemplo, THR $\beta$ 1 y THR $\beta$ 2 presentan los mismos dominios LBD y DBD pero, en cambio, la región A/B es diferentes en ambos receptores. La Región C o DBD (*DNA Binding Domain*), compuesta de dos dedos de zinc, es el dominio más conservado entre los NRs y su función principal consiste en el reconocimiento de secuencias específicas de las regiones reguladoras de los genes diana, para su regulación transcripcional (236). La región D o bisagra es variable entre los diferentes NRs. Se trata de una región o puente flexible entre el DBD y el LBD que presenta señales de localización nuclear y secuencias que median la unión a correpresores (45, 121, 221, 226). La región E o LBD (*Ligand Binding Domain*) presenta múltiples funciones. Es responsable de la unión de ligando y de la transactivación dependiente de ligando, mediada esta última por el dominio AF-2, y además media la homo- y hetero-dimerización de los receptores (80). El dominio LBD está constituido por 12  $\alpha$ -hélices (H1-H12). Las hélices forman una cavidad hidrofóbica que acoge al ligando (199). La unión del ligando conlleva un importante cambio conformacional de la estructura del receptor, que conduce a la formación de una estructura más compacta en la que destaca la recolocación de la hélice 12 hacia una posición que cierra la cavidad en la que se encuentra el ligando.

### 3.- Regulación de la expresión génica por los THR.

#### 3.1.- Elementos de respuesta a hormona.

La regulación de la actividad transcripcional por los THR normalmente implica el reconocimiento por parte del receptor de secuencias específicas en los genes diana. Estas regiones se denominan elementos de respuesta a hormonas tiroideas o TREs, que tradicionalmente se pensaba que se localizaban en el promotor proximal del gen diana. Sin embargo, datos recientes han demostrado que estos elementos pueden encontrarse en regiones intragénicas o lejanas al sitio de inicio de transcripción (68).

Mediante el análisis de estos elementos de respuesta, se ha demostrado la existencia de un hexámero o motivo central de reconocimiento, que se denomina hemisítio. Se trata de la secuencia consenso AGGTCA, que reconocen casi todos los NRs, a excepción de los receptores de esteroides de la subclase III (18). Aunque los NRs pueden reconocer estos motivos en forma de monómeros, la mayoría, incluyendo los THR, se unen como homodímeros o como heterodímeros con el RXR, a elementos compuestos por dos motivos hexaméricos, siendo los heterodímeros THR/RXR la forma más activa de los THR (137). Los THR pueden unir TREs cuyos hemisítios están dispuestos como palíndromos (TRE<sub>pal</sub>), repeticiones directas (DRs) o palíndromos invertidos (IPs). Las separaciones óptimas de estos hemisítios son 0, 4 ó 6 nucleótidos, respectivamente (334).

### 3.2.- Mecanismos de regulación de la expresión génica por los THR.

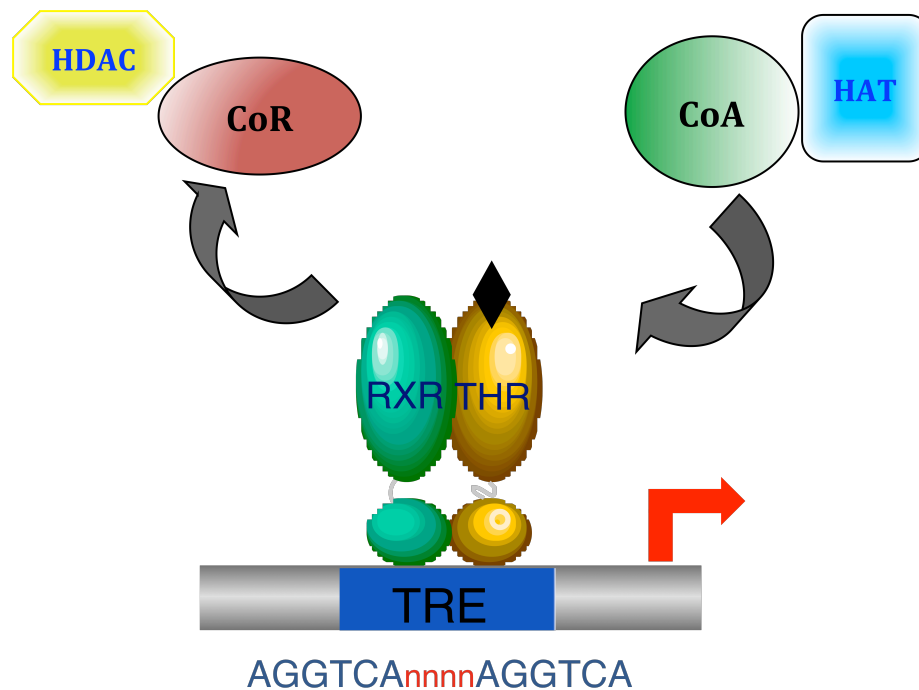
Los THR regulan la expresión de los genes diana mediante diferentes mecanismos:

#### 3.2.1.- Activación transcripcional mediada por TREs positivos.

Los THR en ausencia de ligando tienen un papel como represores constitutivos cuando se unen a TREs positivos (13, 38), debido a la interacción con correpresores como NCOR y NCOR2 (SMRT) (45, 121, 122, 230, 248). Estos correpresores tienen la capacidad de reclutar complejos que contienen desacetilasas de histonas (HDACs), que generan una estructura compacta de la cromatina sobre el promotor, provocando la represión transcripcional. Con la unión del ligando al receptor, se produce un cambio conformacional de éste, que causa la liberación de los correpresores y permite un reclutamiento secuencial de complejos coactivadores (199). Este cambio conformacional implica un replegamiento de la  $\alpha$ -hélice 12 que contiene el dominio AF-2, que conjuntamente con residuos localizados en las hélices 3 y 4 forma un surco hidrofóbico que acomoda el dominio de interacción de los coactivadores con el receptor (145, 239, 305). Estos nuevos complejos coactivadores producen la descompactación de la cromatina y finalmente la activación transcripcional de los genes que regulan (Fig. 3).

Entre las múltiples familias de coactivadores identificadas destacan por su importancia, la familia p160 (NCOA1, NCOA2 y NCOA3). Estos coactivadores, a su vez, son capaces de interaccionar con otros coactivadores como CREBBP/EP300 y TAF5/6L (198), con actividad histona acetil transferasa (HAT) (133). Por otro lado, también se asocian con proteínas histona arginina metil transferasa (HMT), como CARM1 o PRMT. De esta forma, la unión del ligando al receptor provocaría una serie de modificaciones en el “código de histonas” que tiene como fin la activación transcripcional de sus genes diana.

Los receptores también reclutan complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, como SMARCA1. La energía liberada de la hidrólisis de ATP por su subunidad catalítica SMARCA4, moviliza a los nucleosomas, lo que junto a las modificaciones postraduccionales de las histonas, generaría una cromatina menos compacta y más accesible a la maquinaria de transcripción basal (175). Además, se ha descrito que estos receptores en presencia de ligando pueden interaccionar con componentes de la maquinaria basal de transcripción, como son TBP o GTF2B (10, 245) y con complejos multiproteicos como DRIP/TRAP (equivalentes al complejo Mediador en levaduras), que median el reclutamiento de la holoenzima de la ARN polimerasa II, al promotor del gen diana (79).



**Figura 3. Modelo general de acción de los receptores de las hormonas tiroideas.** El heterodímero THR/RXR está unido a TRE positivos en las regiones reguladoras de los genes diana. Con la unión del ligando al receptor se produce la liberación de los correpresores (CoR) y de las histonas deacetilasas (HDACs) y el reclutamiento de coactivadores (CoA) y acetilasas de histonas (HATs), y otras proteínas remodeladoras de la cromatina, que tiene como consecuencia final la descompactación de la cromatina y la activación transcripcional.

### 3.2.2.- Represión transcripcional mediada por TREs negativos.

Los THR también pueden mediar la regulación negativa de genes de un modo dependiente de ligando. En algunos casos, esta represión se debe a una inhibición pasiva debido a la competición con otros transactivadores por los sitios de unión del ADN o bien por la formación de heterodímeros transcripcionalmente inactivos. En otros casos existen TREs negativos que unen receptores y median una represión activa en presencia de ligando. Se han identificado este tipo de elementos, entre otros, en los genes de la tirotropina (*TSH*) y los de la hormona liberadora de tirotropina (*TRH*) (25). En estos elementos negativos, generalmente, el receptor vacío estimula la transcripción y la unión del ligando revierte dicha activación. La posición del TRE en el gen parece ser importante para su regulación. Habitualmente, los TREs negativos se localizan muy próximos al sitio de inicio de transcripción, algunos se sitúan por debajo de la caja TATA (19, 219, 247) y en algunas ocasiones, incluso están presentes en la región 3' no traducida del gen (23).

### 3.2.3 Mecanismos independientes de la unión a TREs.

Por otro lado, los THR pueden regular la expresión de genes independientemente de la unión a TREs, mediante la interferencia con la actividad de otros factores de transcripción o

rutas de señalización (10). De este modo pueden regular negativamente la actividad de promotores que contienen elementos de unión para AP-1 (FOS y JUN), NF $\kappa$ B o CREB (40, 88, 97, 186, 223, 252). Por otro lado, múltiples quinasas activadas por señales extracelulares como las PKA o caseína quinasas afectan a la actividad de los THR $\alpha$ s (265), o de correpresores y coactivadores, como por ejemplo, a través de la fosforilación de NCOR2 por tirosina quinasas que causa su disociación del receptor (119).

Las hormonas tiroideas también ejercen acciones no genómicas mediadas por sus receptores (310). Estos procesos tienen lugar a los pocos minutos de la adición de la hormona e implican la modulación positiva de cascadas de transducción de señales. Así, se ha descrito la interacción de THR $\beta$ 1 unido a T<sub>3</sub>, con la subunidad PIK3R de la PIK3CA en el citosol, sin necesidad de llegar al núcleo, activando esta ruta de señalización (37, 197). La interacción proteína-proteína entre CCND1 y los THR $\alpha$ s modula la actividad del receptor de forma independiente de la actividad CDK (158). También se ha sugerido la existencia de acciones no genómicas de las hormonas tiroideas independientes de los THR $\alpha$ s, en las que su unión a la integrina  $\alpha$ V $\beta$ 3, localizada en la membrana plasmática, activaría la vía de las MAPK que afecta a procesos de angiogénesis y proliferación celular (21, 284). Otro mecanismo diferente es la interacción funcional entre los THR $\alpha$ s y el TGFB1. Este factor promueve la inactivación de la vía de señalización extracelular de las hormonas tiroideas a través de la estimulación de la desiodasa 3 (Dio3) (123).

#### 4.- El Papel de los THR $\alpha$ s en Cáncer.

Existen múltiples evidencias que muestran la implicación de los THR $\alpha$ s en cáncer. Las primeras de ellas provienen del descubrimiento del THR $\alpha$ 1 como homólogo celular del v-erb-a, implicado en la transformación neoplásica en eritroleucemias y sarcomas en aves (254, 291, 292). Además, como se ha mencionado, ratones transgénicos para v-erb-a desarrollan hepatocarcinomas (14). Se ha descrito, por otro lado, que THR $\beta$ 1 interacciona con CCND1 y TP53 (15, 22, 158, 333) y en nuestro laboratorio se ha demostrado que los THR $\alpha$ s son capaces de suprimir la transformación y tumorigénesis mediadas por el oncogén RAS, siendo la isoforma THR $\beta$ 1 la que exhibe una mayor potencia en la inhibición de la formación de colonias de transformación, así como en la inhibición del crecimiento tumoral (88).

Varios estudios han revelado la aparición de mutaciones en los THR $\alpha$ s y su expresión aberrante en diversas neoplasias humanas. Así, se han detectado mutaciones en *THRA* y *THRB* en el 65% y 76%, respectivamente, de los tumores de los pacientes con hepatocarcinoma (159). De la misma forma, el análisis de tumores renales, de mama, tiroides y gástricos, ha revelado una alta incidencia de mutaciones en los genes de los THR $\alpha$ s (93, 134,

159-161, 232, 269, 308). Algunas de las mutaciones descritas producen defectos en la unión de THR $\beta$  al ligando de modo que no se produce la liberación de correpresores, impidiéndose la activación de la transcripción (44). Estos mutantes, además, se comportan generalmente como dominantes negativos de la actividad transcripcional del receptor nativo.

Se ha observado un grado variable de silenciamiento de la expresión de *THRB* por hipermetilación de su promotor en tumores y en varias líneas celulares de cáncer de mama (156). Por otra parte, en tumores de diversas etiologías, se han observado deleciones en el cromosoma 3p, en el área donde se encuentra *THRB* (150, 270). Además se ha descrito la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 3p en pacientes con cáncer de mama (6). Del mismo modo, el locus donde se encuentra *THRA* se encuentra también en un área con frecuentes pérdidas de heterocigosidad en cáncer de mama (85, 86). Los niveles de expresión de THR $\beta$ 1 se encuentran también disminuidos en cáncer de tiroides respecto al tejido normal (30) y se ha descrito una alta incidencia de mutaciones en ambos receptores en pacientes con carcinomas papilares de tiroides (232).

Una mutación en el gen *THR $\beta$ 1* (*THR $\beta$ PV*), que presenta actividad dominante negativa y fue detectada en pacientes con síndrome de resistencia a hormona tiroidea, convierte al THR $\beta$ 1 en un potente oncogén (135). Los ratones *knock-in* homocigóticos para esta mutación, desarrollan espontáneamente carcinoma de tiroides y metástasis en pulmón y corazón (282). También se ha descrito, que estos ratones desarrollan hiperplasia mamaria a través de una activación aberrante de STAT5 (99).

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que la expresión estable de THR $\beta$ 1 en líneas celulares de hepatocarcinoma y carcinoma mamario, produce un retraso en la formación de tumores inducidos en ratones y una inhibición en la formación de metástasis (182). Esta inhibición tumoral se debe principalmente a que la reexpresión del receptor produce una disminución en la expresión de ARNm de genes que codifican para receptores de factores de crecimiento como EGFR1, ERBB3 e IGFR1; y también de genes prometastásicos, como *Cxcr4*, *Ccr1*, *Ccr6* y *Met*, entre otros. En este estudio, utilizando ratones KO para los *Thrs*, se demuestra que los receptores endógenos limitan la progresión de los tumores de piel en un modelo de carcinogénesis química. Asimismo, en otro laboratorio, utilizando otro modelo de carcinogénesis química en ratas, se ha observado que la administración de T3 o del agonista del THR $\beta$ , GC-1, produce la regresión de nódulos preneoplásicos hepáticos (222).

Por otra parte, esta actividad inhibitoria de la proliferación celular y supresora tumoral contrasta con el papel que la hormona exhibe, por ejemplo, en células GH4C1 (117) o en hepatocitos normales (53, 179), donde actúa como agente mitogénico. Esta dualidad funcional

pone de manifiesto que la respuesta celular al tratamiento con hormona o a la expresión de los THR $\alpha$ 1 y THR $\beta$ 1 depende de multitud de factores, y es el resultado de la expresión diferencial de las distintas isoformas, de la de los correguladores o de la interacción funcional con diferentes de factores y rutas de señalización.

Aunque todas las evidencias anteriormente expuestas indican un papel de los THR $\alpha$ 1 y THR $\beta$ 1 como supresores tumorales, lo que concuerda con el hecho de que la expresión de estos receptores tiende a perderse en la mayoría de líneas celulares y tumores, los mecanismos por los cuales los THR $\alpha$ 1 y THR $\beta$ 1 ejercen estas actividades no están totalmente esclarecidos.

En este trabajo se han estudiado solamente las isoformas principales de los THR $\alpha$ 1 y THR $\beta$ 1; con el objeto de simplificar la nomenclatura, en adelante nos referiremos a las mismas como THRA y THRB, respectivamente.

## 5.- Efecto de las Hormonas Tiroideas en la Función Mitocondrial.

Las hormonas tiroideas promueven el aumento del consumo de oxígeno, del metabolismo basal, de la temperatura corporal y de la frecuencia cardiaca. En experimentos con ratas hipotiroideas (286, 287), estos cambios eran evidentes a partir de las 24-48 horas de la administración de T3. De estos experimentos y otros se puede concluir que el consumo de oxígeno es mayor en la condición hipertiroidea que en el hipotiroidismo (28). A las mismas conclusiones se llegan cuando se utilizan cultivos de hepatocitos primarios (205). Aunque las primeras evidencias que indican la influencia de las THs sobre la mitocondria datan de 1895 (174), todavía hoy no se conocen del todo sus mecanismos moleculares (225). Sin embargo, podemos dividir estos mecanismos en genómicos o no genómicos.

Los efectos fisiológicos más evidentes provocados por las THs se inhiben sustancialmente si se administra el inhibidor de la transcripción actinomicina D, indicando por tanto un control transcripcional de la función mitocondrial. De hecho, la administración de T3 conduce a un aumento de los niveles de ARNm de un número elevado de genes mitocondriales codificados por el núcleo o por el genoma mitocondrial (7, 90, 128, 130, 172, 200, 297, 317). El aumento de la transcripción del ADN mitocondrial (ADNmt) tiene lugar a través del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), cuyos niveles son regulados a su vez por T3 (91, 262, 303), y que actuaría en la mitocondria estimulando tanto la replicación como la transcripción mitocondrial. TFAM se une a secuencias de los promotores del ADN mitocondrial (secuencias *upstream enhancers*) estimulando la transcripción de los genes que codifican las proteínas mitocondriales, vitales para el transporte de electrones y la síntesis de ATP.

Por otra parte, las THs son capaces de regular la función mitocondrial a través de los denominados factores respiratorios nucleares (NRFs). El más importante de estos factores en

la biogénesis mitocondrial es el factor de respiración nuclear NRF1 (49, 71, 262, 263, 304). Se ha descrito que en hepatocitos la hormona T3 regula transcripcionalmente NRF1 a través de TREs localizados en su región promotora (298, 314). A su vez, NRF1 regula genes respiratorios codificados por el núcleo a través de su unión a secuencias consenso situadas en los promotores de genes implicados en la función mitocondrial (257), tales como *TFAM* (70) o citocromo c (*Cytc*) (303, 335). NRF2 al igual que NRF1, induce la expresión de genes mitocondriales codificados por el núcleo, como *TFAM* (256), y otros que codifican para enzimas antioxidantes a través de su unión a AREs (elementos de respuesta antioxidante), regulando así la respuesta celular al estrés oxidativo (206).

Las THs también inducen la expresión de un regulador clave de la función mitocondrial, PPARGC1A (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha*) que sirve como coactivador para una gran variedad de NRs. PPARGC1A, que es regulado tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional por la hormona T3 (126, 298, 312, 330), induce la expresión de NRF1 y NRF2 y aumenta su actividad transcripcional (12, 231, 249). Además de su papel en la biogénesis mitocondrial, PPARGC1A regula la termogénesis adaptativa en el tejido adiposo marrón y la gluconeogénesis hepática. Otro miembro de la familia de estos activadores es PPARGC1B que, al igual que PPARGC1A, es regulado por T3 y comparte muchas características funcionales con PPARGC1A, como la estimulación de la actividad mitocondrial, y que participa en la respuesta adaptativa durante el estrés metabólico (155, 312). A través de estos factores de transcripción mencionados, la hormona T3 induce un perfil característico de expresión que ha sido observado en diferentes modelos animales y celulares y que es específico para cada uno de ellos (43, 112, 188, 233, 268). Dentro de las seis primeras horas post-tratamiento tienen lugar los cambios de expresión temprana, mientras que el segundo patrón diferenciado, de expresión tardía, tiene lugar después de las 48 horas (312, 314). Estos cambios de expresión conducen a los cambios fisiológicos observados.

Sin embargo, las THs también pueden influir en la función mitocondrial a través de mecanismos rápidos y directos, mediante las denominadas acciones "no genómicas", que son evidentes después de tiempos cortos (de minutos a pocas horas) y pueden ser mediadas a través de rutas de transducción de señales (cAMP, quinasas, inositol fosfatos, etc.). Uno de estos mecanismos implicaría la acción de la T3 a través de un receptor en la propia mitocondria (39, 326, 327). Se trata de un producto de transcripción alternativo del gen *Thra*, denominado p43, que presenta una delección del extremo amino-terminal (AF-1), pero posee los dominios DBD, LBD y el dominio de transactivación dependiente de ligando (313). Se ha propuesto que este receptor actuaría sobre el ADNmt para activar su expresión, a través de su unión a TREs similares a los encontrados en el núcleo. Otros mecanismos implican la acción de



diiodotironinas (3-3'-T2 y 3-5'-T2) directamente sobre la mitocondria a través de estos mismos receptores (143, 144).

## 6.- Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y Estrés Oxidativo.

### 6.1.- Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).

Las ROS son de dos tipos, radicales libres que contienen moléculas portadoras de uno o más electrones desapareados en sus orbitales exteriores, o no radicales que no contienen electrones desapareados pero que son químicamente reactivas y pueden convertirse en ROS radicales (101, 294). Las ROS radicales más comunes en los sistemas biológicos son el anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) y radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ). Algunos ejemplos de ROS no radicales son el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ozono, peroxinitrato e hidróxido.

### 6.2.- La función de las ROS en los sistemas biológicos y sus efectos.

Las ROS son esenciales para los sistemas biológicos: regulan muchas rutas de transducción de señales implicadas en crecimiento y diferenciación, regulan la actividad de enzimas (como la ribonucleótido reductasa), median la inflamación estimulando la producción de citoquinas y ayudan a eliminar patógenos y partículas extrañas (201, 315, 316). Las ROS radicales son moléculas altamente reactivas, debido a que suelen captar un electrón de moléculas estables para de esta forma alcanzar su estabilidad electroquímica. Si esto se produce, la molécula que cede el electrón pasa a ser un nuevo radical libre, lo que inicia una reacción en cadena (32, 296). Así, las ROS producen la modificación oxidativa de moléculas como ADN, proteínas o lípidos. Un aumento en los niveles de ROS puede estimular la proliferación celular o incluso conducir a apoptosis o a senescencia celular. Sin embargo, un incremento grande en los niveles de ROS puede causar un daño oxidativo irreversible y la muerte celular por necrosis (76). La respuesta de la célula depende por tanto de la magnitud de las ROS y de la capacidad de eliminación de la célula por los sistemas antioxidantes.

### 6.3.- El origen de las ROS en la célula y su eliminación.

La principal fuente de ROS en la célula es la mitocondria. Algunos electrones de la cadena transportadora de electrones (CTE) pueden "fugarse" o perderse (*electron leakage*) y reducir el oxígeno molecular para producir el anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), que puede ser convertido en otras ROS. Se ha estimado que el 98% de los electrones transferidos a lo largo de la CTE están implicados en la producción de ATP, pero el 1-2% restantes producen  $\cdot\text{O}_2^-$  (26, 41, 169, 274, 276). En fagocitos y algunas células cancerosas, los complejos de NADPH oxidasa pueden producir ROS. Las ROS también pueden producirse como productos secundarios en



ciertas reacciones bioquímicas como la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en peroxisomas, la síntesis de prostaglandinas y reacciones detoxificantes que implican al citocromo P450.

Las células han desarrollado complejos sistemas de protección para limitar la producción de ROS y su acumulación en los diferentes compartimentos celulares, como la mitocondria, la membrana plasmática, el citosol o los peroxisomas. La protección de estos sistemas consiste en diferentes estrategias como la conversión de ROS en moléculas menos reactivas a través de un proceso conocido como *scavenging* o mediante mecanismos que impiden la reacción de ROS con otras moléculas para generar especies más reactivas (229). Estos sistemas incluyen las enzimas superóxido dismutasas (SOD) (26, 33, 163, 168), catalasa (Cat), peroxirredoxinas, tioredoxinas (Trx), el sistema glutatión y las proteínas desacoplantes (UCPs). En la células también hay moléculas orgánicas que ayudan este proceso de detoxificación como son el ascorbato, el piruvato, los flavonoides y los carotinoides (77).

### 6.4.- Efecto de las hormonas tiroideas en la producción y eliminación de ROS.

Como se ha comentado más arriba, la condición hipertiroides se asocia a un estado celular hipermetabólico y a un mayor consumo de oxígeno. Debido a este incremento en el consumo de oxígeno, se incrementa de forma directa la generación de ROS mitocondrial (301). Cuando la producción de ROS excede a los sistemas de detoxificación, se produce estrés oxidativo que produce lesiones oxidativas en todos los compartimentos celulares. Existen diversos trabajos donde se ha puesto de manifiesto que el tratamiento con THs conduce a la aparición de lesiones oxidativas en proteínas, lípidos o ADN en diversos órganos y modelos de experimentación (revisado en (301)). También, el papel de las THs en el estatus celular antioxidante se ha estudiado extensivamente, sobre todo en tejidos de rata, aunque los resultados obtenidos han sido en algunas ocasiones contradictorios (301). A pesar de ello, podemos concluir que la inducción de estrés oxidativo viene acompañada de una respuesta celular antioxidante y que las THs regulan este equilibrio para intentar mantener la homeostasis redox celular.

## 7.- Respuesta Celular al Daño Genómico y su Reparación.

### 7.1.- Generalidades sobre la respuesta celular al daño genómico y su reparación.

La actividad metabólica de la célula o factores ambientales como agentes químicos o físicos, como las radiaciones, pueden provocar lesiones en el ADN que pueden alterar o inhibir la capacidad de la célula para transcribir un gen o incluso producir mutaciones y comprometer su supervivencia. Las lesiones que se producen en el ADN debido a procesos endógenos incluyen, entre otras, la oxidación, alquilación (generalmente metilación) e hidrólisis de bases, o

el desapareamiento de bases durante la replicación del ADN. Los agentes externos pueden inducir entre otras lesiones la formación de dímeros de pirimidina, la generación de aductos en el ADN y roturas en el ADN tanto de cadena simple (SSBs, *single-strand breaks*) como de doble cadena (DSBs, *double-strand breaks*).

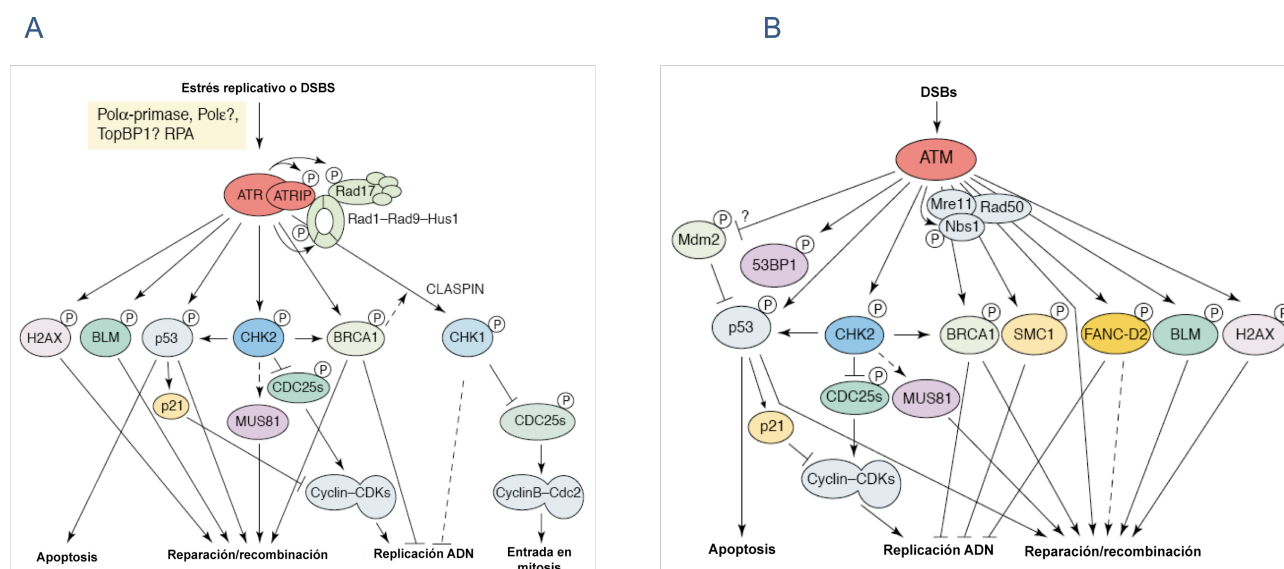
La capacidad reparadora de la célula es vital para mantener la integridad del genoma y la función normal del organismo. Esta capacidad depende de varios factores, como el tipo celular, la edad de la célula y el ambiente extracelular. En general, la respuesta de la célula cuando acumula daño genómico depende de forma primordial del tipo y magnitud del daño infligido al ADN. El daño genómico puede producir una cierta inestabilidad genómica e inducir la proliferación celular, provocar la entrada en apoptosis o senescencia celular, producir una desregulación de la división celular e inducir un tumor o, incluso, provocar necrosis celular (116, 170, 173).

La reparación del ADN implica la acción de multitud de genes y mecanismos. En cuanto a las roturas del ADN, si sólo una de las cadenas está afectada, la cadena no afectada puede servir como molde para su reparación. Existen varios mecanismos de excisión/reparación (309). El BER (*base excision repair*) se encarga de la reparación de la base afectada por oxidación, alquilación, hidrólisis y deaminación, e implica varias actividades como ADN glicosilasa, endonucleasa, polimerasa y ligasa. El NER (*nucleotide excision repair*) reconoce lesiones que distorsionan la hélice, como los dímeros de pirimidinas. Una forma especializada de NER implica la reparación de estas lesiones acoplada con la transcripción (*transcription-coupled repair*). El mecanismo por el cual se reparan errores de desapareamiento durante la replicación o recombinación, se denomina MMR (*mismatch repair*). Por otro lado, las lesiones en ambas cadenas del ADN (DSBs) son especialmente peligrosas y pueden producir reorganizaciones genómicas. Existen tres mecanismos implicados en la reparación de DSBs (309). El NHEJ (*non-homologous end joining*), MMEJ (*microhomology-mediated end joining*) y la recombinación homóloga (*homologous recombination*). En el NHEJ, una ligasa especializada une los dos extremos. Para una reparación correcta, el NHEJ se basa en secuencias cortas homólogas presentes en las extensiones de ADN de cadena simple. Si estos extremos son compatibles la reparación es correcta, pero a veces este mecanismo puede introducir mutaciones. EL NHEJ opera también en la unión de DSBs durante la recombinación V(D)J en linfocitos. La recombinación homóloga requiere una secuencia idéntica o casi idéntica cercana para servir como molde en la reparación. La maquinaria enzimática responsable de este tipo de reparación es similar a la responsable de los entrecruzamientos cromosómicos durante la meiosis. Esta ruta permite la reparación del cromosoma dañado usando una cromátida hermana (disponible en G2, después de la replicación del ADN) o un cromosoma homólogo como molde. La propia maquinaria de replicación puede producir DSBs en su intento de

sintetizar ADN a través de SSBs o de lesiones sin reparar. Estas DSBs pueden incluso llegar a colapsar la horquilla de replicación. Por otra parte, las topoisomerasas pueden introducir SSBs o DSBs durante de relajación del superenrollamiento del ADN cercano a la horquilla de replicación como parte de su mecanismo bioquímico enzimático.

Cuando ocurre un daño en el ADN, los puntos de control (*checkpoints*) del ciclo celular se activan induciendo una pausa en el ciclo celular para corregir las lesiones producidas antes de continuar la división celular. Estos puntos de control tienen lugar en G1/S y G2/M principalmente, aunque existe otro punto de control en la fase S (*intra-S checkpoint*). Estos puntos de control están controlados por dos quinasas fundamentales: ATM (*Ataxia telangiectasia mutated kinase*) y ATR (*Ataxia telangiectasia related kinase*). ATM responde a DSBs y a alteraciones en la estructura de la cromatina (153), mientras que ATR opera principalmente en las horquillas de replicación colapsadas (166). Estas quinasas fosforilan una serie de dianas en una cascada de transducción de señales, dando lugar, eventualmente, a un bloqueo en el ciclo celular. Algunas de las proteínas mediadoras encargadas de transmitir la señal de activación a otras proteínas que actúan por debajo de estas quinasas son BRCA1, MDC1, TP53 y TP53BP1 (210) (Fig. 4).

ATR puede responder a agentes que interfieren con la replicación celular como son la hidroximetilurea (HU), la luz ultravioleta (UV) o los agentes alcalinos (1, 8, 111, 171, 213, 324), y activa el punto de control de la fase S para bloquear la progresión del ciclo. ATR fosforila y activa a CHEK1, que transmite la señalización al núcleo para inducir el bloqueo de la replicación del ADN (Fig. 4A) (167, 210). El complejo mediador (MRN; MRE11-RAD50-NBS1) actúa como sensor para ATM y recluta las proteínas necesarias para la señalización en las DSBs (8, 153, 213). Cuando ATM se activa, fosforila a CHEK2, lo que le permite homodimerizar y activar a otros miembros de la vía para finalmente bloquear la replicación y activar la reparación del daño producido (3) (Fig. 4B).



Adaptado de **Osborn A. et al. Trends Cell Biol. 2002**

**Figura 4. Las rutas de señalización controladas por ATM y ATR en respuesta a daño en el ADN. A)** Vía dependiente de ATR en respuesta a estrés replicativo y roturas de doble cadena (DSBs). **B)** Vía dependiente de ATM en respuesta a DSBs. ATM y ATR fosforilan las proteínas CHEK y otros substratos efectores que transmiten la señal de activación de los puntos de control al núcleo para inducir la inhibición de la replicación del ADN y para promover su reparación.

Un intermediario clave de los sensores es la variante H2AFX de la histona H2AF (74, 237). Esta histona se fosforila en condiciones en las que se produce daño en el ADN, aunque predominantemente ocurre tras la formación de DSBs (42). A los pocos segundos de haberse producido DSBs en el ADN, miles de moléculas de H2AFX son fosforiladas ( $\gamma$ H2AFX), y se reclutan en los sitios de las roturas, formándose los denominados focos de daño al ADN (244). Muchos de los componentes de la respuesta de daño al ADN (*DNA damage response*, DDR), como son T53BP1 y MCD1, entre otros, colocalizan en estos focos junto a  $\gamma$ H2AFX (216, 235, 278).

## 7.2.- Relación entre la actividad de los receptores nucleares (NRs) y el daño genómico.

La actividad normal de algunos NRs da lugar a la aparición de daño genómico. Como se ha mencionado antes, existe una clara asociación entre el estrés oxidativo y la acción de las THs. Otros ligandos de NRs inducen lesiones oxidativas aunque los mecanismos pueden ser distintos. Por ejemplo, el receptor de estrógenos (ER) produce daño oxidativo en el ADN por una inhibición en la actividad de los sistemas antioxidantes como la catalasa y glutatión. La inducción de estrés oxidativo por los estrógenos parece influir en la iniciación y/o progresión de la neoplasia mamaria (196, 207).

Por otra parte, un campo actual emergente es la relación no causal entre la activación transcripcional por los receptores nucleares y otros factores de transcripción, la aparición de daño genómico y el reclutamiento de componentes de la maquinaria de reparación del ADN, como XCC6, XRCC5, ATM, PARP1, o TOPO2B (103, 104, 131, 157, 176, 184, 195, 220, 321). Se ha descrito que la unión de ligando al receptor de andrógenos (AR) promueve la formación de DSBs en sitios específicos a través del reclutamiento de dos tipos de maquinarias enzimáticas implicadas en la reparación mediada por el NHEJ. Estas roturas en el ADN se han asociado a la aparición de translocaciones en tumores (157, 177). En otro trabajo se ha puesto de manifiesto que hay una relación entre la activación transcripcional y la generación de DSBs, mediada por la topoisomerasa II $\beta$  (TOPO2B) (131). Esta enzima genera DSBs en sitios específicos de los promotores de genes tras la activación del AR. En estos sitios de rotura, además, se reclutan componentes de la reparación del ADN y de la maquinaria de transcripción. Se ha sugerido que los componentes de la reparación del ADN facilitarían los cambios dinámicos en la organización de la cromatina necesarios para la adecuada activación transcripcional.

En cuanto a los THR, no se ha descrito la implicación de la maquinaria de reparación del ADN en la activación transcripcional. Por otra parte, la influencia de los THR en la reparación del ADN sólo se ha descrito para el intestino, donde se expresa abundantemente su isoforma  $\alpha$ . El THRA parece estar implicado en la regeneración de epitelio intestinal a través de la regulación de la tasa de renovación y apoptosis después de irradiación. En ratones *Thra*<sup>-/-</sup>, se produce un retraso en la activación de TP53 en respuesta a irradiación (141).

### 7.3.- Daño genómico y biogénesis mitocondrial. Papel de ATM.

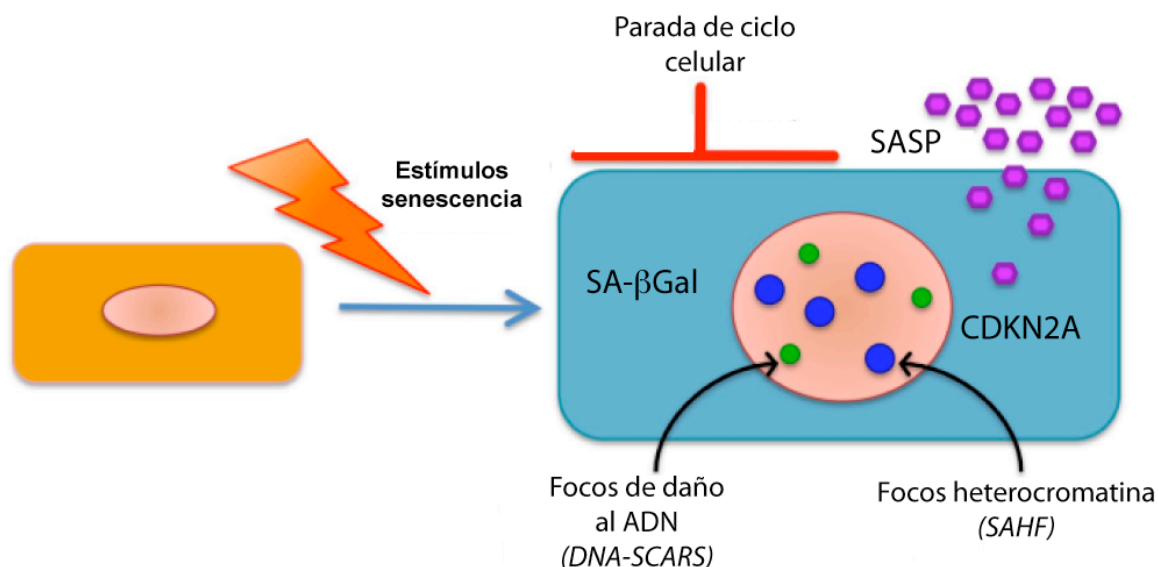
Se ha descrito que el daño al ADN, como las DSBs, estimulan la biogénesis mitocondrial (139, 238). Estas acciones parecen estar mediadas por ATM y PPARK. La activación de ATM por DSBs causadas por distintos agentes químicos, como el etopósido, inducen la activación de ATM, que a su vez es capaz de fosforilar y activar a PPARK en su subunidad  $\alpha$  (Thr<sup>172</sup>) y de esta manera disparar la cascada de activaciones transcripcionales mediadas por PPARGC1A, NRF1 y TFAM (84). De la misma forma, se ha sugerido que la generación de ROS es capaz de estimular la biogénesis mitocondrial aunque los mecanismos no están claros y podrían implicar acciones no genómicas (189, 253).

## 8.- Senescencia Celular.

### 8.1.- Definición y características.

La senescencia celular fue formalmente descrita hace más de cuarenta años como un proceso que limita la proliferación o el crecimiento celular de células normales humanas en cultivo (110). Se define esencialmente como un bloqueo irreversible del crecimiento celular que ocurre cuando las células están sometidas a algún tipo de estrés, como la disfunción telomérica, el estrés oxidativo, el daño genómico y diferentes drogas quimioterapéuticas (51). Con excepción de las células madre embrionarias (193), la mayoría de las células con capacidad de dividirse, incluyendo algunas células tumorales, pueden entrar en senescencia si se las estimula de manera apropiada (36, 266).

Las células senescentes son activas metabólicamente y se caracterizan principalmente por presentar un bloqueo en la proliferación celular permanente y no reversible a través de estímulos fisiológicos. Son células generalmente más grandes que las normales (110) y expresan una actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ gal) (66), que es, probablemente, consecuencia del incremento en la masa lisosomal (151). La mayoría de las células senescentes a diferencia de las células quiescentes o diferenciadas, expresan el gen supresor de tumores CDKN2A (p16<sup>INK4a</sup>) (4, 29, 106, 261, 277), el cual regula negativamente la proliferación celular a través de la inhibición de la quinasa CDK4A. CDKN2A se induce como respuesta a estrés en el cultivo y daño en el ADN telomérico o intracromosomal (29, 129, 148, 234, 241, 290). Las células senescentes se caracterizan también por presentar una respuesta persistente al daño en el ADN (DDR persistente) y por presentar alteraciones en la cromatina que contiene ATM y ATR activados (58, 114, 242) en focos de daño al ADN que se denominan *DNA-SCARS*. Además, presentan dominios nucleares de heterocromatina enriquecidos en modificaciones de histonas como H3F3A K9 3me (SAHF, focos de heterocromatina asociados a senescencia). Las células senescentes son muy activas secretando factores de crecimiento, proteasas, citoquinas y otros factores con actividad auto y paracrina (2, 56, 57, 142), conformando lo que se denomina el fenotipo de secreción asociado a senescencia (SASP) (Fig. 5).



Adaptado de **Rodier F.** *J Cell Biol.* 2011

**Figura 5. Marcadores de las células senescentes.** Las células senescentes se caracterizan por un bloqueo proliferativo, la expresión de CDKN2A y un daño genómico persistente (focos de daño en el ADN, DNA-SCARS) o focos de heterocromatina (SAHF). Además, expresan una actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ gal) y secretan diversos factores de crecimiento, citoquinas, proteasas y otras proteínas conformando el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP).

### 8.2.- Tipos de senescencia celular e inductores.

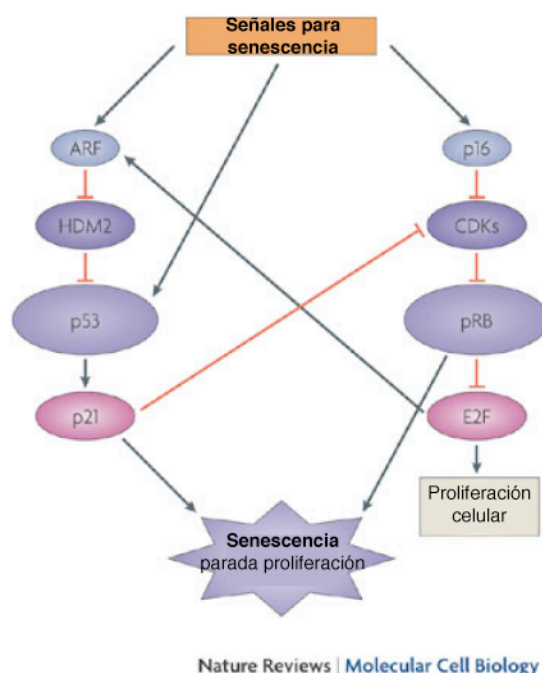
La senescencia celular puede clasificarse principalmente en dos tipos: la senescencia replicativa y la senescencia prematura o inducida (260).

La senescencia replicativa es la causa principal de la limitación del crecimiento de células normales en cultivo. Con cada replicación celular se produce un acortamiento telomérico, ya que la mayoría de las células primarias no expresan altos niveles de telomerasa. Este proceso genera cromosomas con telómeros cada vez más cortos y con pérdida de funcionalidad. La consecuencia más importante de la disfunción telomérica es la aparición de fusiones cromosomales, lo que produce finalmente la ganancia o pérdida de cromosomas completos (11, 24, 105). Así, el acortamiento de telómeros produce una DDR persistente que tiene la capacidad de iniciar y mantener el bloqueo de crecimiento en senescencia (58, 114, 242, 243, 283). Como consecuencia, se produce la activación del gen supresores de tumores TP53 que es un importante mediador de la senescencia inducida por el acortamiento de telómeros (48, 94).

La senescencia prematura se da en las células susceptibles que se exponen a diferentes tipos de estrés como el daño al ADN, estrés oncogénico, estrés oxidativo, etc.



La inducción de senescencia celular depende de las dos rutas principales de supresores tumorales, CDKN2D/TP53 y CDKN2A/RB1 (36). Respecto a la vía de TP53, la proteína CDKN1A (P21) es una diana transcripcional muy importante de TP53 y también un mediador de la senescencia dependiente de esta vía, que inhibe la progresión a través del ciclo celular (31). La ruta dependiente de CDKN2A/RB1, se activa normalmente de forma secundaria, después de TP53. Los oncogenes y otros tipos de estrés son capaces de inducir la expresión de CDKN2A, el cual es regulador positivo de RB1 (267). Cuando RB1 se activa (estado hipofosforilado), reprime la transcripción de genes dependientes del factor E2F, muchos de los cuales promueven la proliferación celular (267).



Adaptado de **Campisi J., d'Adda di Fagagna. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005**

**Figura 6. Principales rutas de genes supresores de tumores implicadas en la senescencia celular.** La vía dependiente de TP53 se activa en respuesta a daño en el ADN, disfunción telomérica y estrés genotóxico como el inducido por ROS. La transcripción de genes dependientes de TP53 como CDKN1A (P21) produce la parada del ciclo celular. La ruta dependiente de P16/RB1 (CDKN2A/RB1) se activa por oncogenes y otros tipos de estreses. La activación de esta vía induce la represión de genes diana de E2F y otros implicados en proliferación celular, y conduce finalmente al bloqueo de la progresión del ciclo celular.

### 8.3.- La senescencia celular como mecanismo supresor tumoral.

De forma simplificada se podría definir el cáncer como una enfermedad del ciclo celular caracterizada por una proliferación celular descontrolada causada por señales oncogénicas. Para evitar la replicación incontrolada, las células han desarrollado varios tipos de mecanismos antiproliferativos que son inducidos por diferentes supresores tumorales en respuesta a estas señales. La senescencia celular representa una de las primeras barreras antitumorales que



posee la célula y su papel como supresor tumoral está ampliamente aceptado (27, 47, 52, 127, 187, 271). La senescencia celular depende de las principales rutas de supresión tumoral, las vías de CDKN2D/TP53 y CDKN2A/RB1. En estudios en tejidos humanos y en ratones que tienen predisposición a desarrollar tumores, se ha observado que la senescencia celular representa un mecanismo de supresión tumoral *in vivo* y ha sido posible su detección en lesiones premalignas. Por ejemplo, en los nevus melanocíticos premalignos humanos y en adenomas de colon, podemos encontrar marcadores de senescencia celular tales como la SA- $\beta$ gal y una DDR persistente. Sin embargo, la presencia de células senescentes es muy escasa en melanomas malignos y adenocarcinomas, que se desarrollan a partir de las lesiones anteriores (16, 187).

### 8.4.- Receptores nucleares y senescencia celular.

Algunos ligandos de los NRs inducen inhibición de la proliferación celular y senescencia celular. El tratamiento de células de carcinoma mamario con ácido retinoico (RA) conduce a la inhibición de la proliferación celular y a la acumulación de células con un fenotipo indistinguible del de las células senescentes (67). De forma similar, en un subtipo celular de neuroblastomas se produce senescencia celular inducida por RA, a través de un incremento temprano de CDKN2A (P16), seguido de un aumento ulterior y sostenido de CDKN2C (P18) (307). Los andrógenos también son capaces de bloquear la proliferación de varias líneas tumorales a través de la inhibición de CCND1 mediada por CDKN1A (P21). Además, muy recientemente, se ha descrito que la activación constante del receptor de andrógenos (AR) conduce a senescencia celular activando RB, de forma independientemente de TP53, a través de la inducción de ROS. Sin embargo, los autores no observaron indicios de daño genómico (190).

## Objetivos



Varias evidencias indican que el receptor de hormonas tiroideas THRB se comporta como un gen supresor de tumores: su expresión tiende a perderse según progresa la malignización de varios tumores y es capaz de inhibir la transformación celular y el crecimiento de tumores inducidos en ratones. Además, el tratamiento con la hormona T3 o con agonistas del THRB da lugar a una regresión tumoral de nódulos preneoplásicos de hepatocarcinoma de rata y a la inhibición de la proliferación de varios tipos celulares.

Por otro lado, la inducción de senescencia celular se considera como una primera barrera de defensa contra la transformación celular y la tumorigénesis. En este fenómeno parece jugar un papel importante la aparición de daño al ADN, que puede ser consecuencia tanto de acortamiento telomérico, como de daño replicativo u oxidativo. Con el fin de conocer si parte de los efectos anti-transformantes y anti-tumorales del THRB y de la hormona T3 pudieran estar mediados por inducción de senescencia celular, así como los mecanismos implicados en este fenómeno nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1. Estudiar el efecto de la hormona y del THRB en proliferación y senescencia celular, utilizando como modelo los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs).**
- 2. Estudiar el papel de proteínas clave de este proceso como TP53 o ATM en dichos efectos.**
- 3. Estudiar la influencia de la hormona y del THRB en daño genómico en MEFS.**
- 4. Examinar el tipo de daño al ADN producido.**
- 5. Analizar la aparición de daño genómico en tejidos de animales hipertiroides.**
- 6. Examinar el efecto de la hormona y del THRB en la función mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).**



## **Materiales y Métodos**



## 1.- Líneas celulares.

En este trabajo se utilizaron los siguientes modelos celulares:

Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, *Mouse Embryonic Fibroblasts*) obtenidos a 13,5 días post-coito, según el protocolo descrito previamente (211). MEFs obtenidos a partir de ratones KO (*knock-out*) para el gen *Tp53* (TP53KO), cedidos por el Dr. Manuel Serrano (CNIO, Madrid) (261). MEFs KO para los genes que codifican para los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de la hormona tiroidea THRA<sup>(-/-)</sup>B<sup>(-/-)</sup> (THRABKO) inmortalizados en cultivo, que fueron cedidos por el Dr. Jacques Samarut (IGFL, Francia). MEFs KO para el gen *Atm* (ATMKO) cedidos por la Dra. Elsa Callen (NIC, Estados Unidos).

Las líneas celulares humanas usadas en este trabajo fueron las células 293T que son epiteliales de riñón embrionario, que provienen de la línea celular 293 (HEK293, ATCC: CRL-11268) (217), en la que se ha insertado el antígeno T del virus SV40 (69).

Todas las líneas celulares empleadas se cultivaron en medio Eagles modificado por Dulbecco (DMEM, pH 7,35) (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco-BRL), 2 mM glutamina (Gibco-BRL), 100 U/ml de penicilina (Gibco-BRL) y 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina (Gibco-BRL), a excepción de los MEFs THRABKO, que se cultivaron en el mismo medio sin piruvato. Los experimentos con la hormona T3 (triiodotironina), se realizaron en suero fetal bovino (SFB) deplecionado de hormonas tiroideas (SFB-T3) mediante tratamiento con la resina AG-1-X8 (Bio-Rad), a una concentración final de 5 nM y durante los tiempos indicados en cada caso. Las células se cultivaron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera que contenía un 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de humedad relativa.

## 2.- Reactivos, kits y anticuerpos.

Los reactivos químicos, kits y anticuerpos empleados en este trabajo se detallan en las siguientes tablas:



Reactivo	Disolución Stock	Concentración final	Proveedor y referencia
2-vinilpiridina	1 M	0,01 M	Sigma (132292)
2',7'-diclorofluoreceína diacetato	100 mM en DMSO	20 $\mu$ M	Calbiochem (287810)
Antimicina A	5 mM en etanol	2,5 $\mu$ M	Sigma (A8674)
Aprotinina	1 mg/ml en etanol	2 $\mu$ g/ml	Sigma (A1153)
<i>Compound C</i> ( <i>InSolution™ AMPK Inhibitor</i> )	10 mM en DMSO	20 $\mu$ M	Calbiochem (171261)
<i>Cloned Pfu DNA polymerase</i>	2,5 U/ $\mu$ l	2,5 U	Stratagene (600153-82)
Cocktail de inhibidores de fosfatasas (2 y 3)	100%	1% en buffer de lisis	Sigma (P5726 y P0044)
DAPI (Ex.359, Em.461)	100%	1/500 en PBS pH7.5	D1306 (Molecular Probes)
DePex	100%	100%	Serva (18243)
<i>DNA polymerase</i>	1 U/ $\mu$ l	0,5 U	Bitools (10.002)
DNase I, <i>Amplification Grade</i>	1 U/ $\mu$ l	1 U	Invitrogen (18068-015)
dNTPs	10 mM	200 $\mu$ M	Applied Biosystems (AM8200)
DpnI	10 U/ $\mu$ l	1 U	Invitrogen (15242-019)
dUTP-11-biotina	1 mM	200 $\mu$ M	Thermo Scientific (#R0081)
<i>FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)</i>	2X	1X	Roche (04 913 850 001)
FCCP	1 mM en etanol	0,5 $\mu$ M	Sigma (C2920)
Formaldehído	37%	1%	Merck (1.03999)

Reactivo	Disolución Stock	Concentración final	Proveedor y referencia
Glicógeno	20 mg/ml	20 µg/reacción	Roche (10 901 393 001)
Glutamina	200 mM (100X)	2 mM en DMEM, pH 7,35	Gibco-BRL (25030-123)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30%	600 µM/ 1 mM	Sigma (H1009)
Hidroxiurea	1 M en H <sub>2</sub> O	1 µM	Sigma (H8627)
Higromicina B	75 mg/ml en H <sub>2</sub> O	75 µg/ml	Sigma (H3274)
Ioduro de propidio	100 µg/ml en PBS pH 7,5	50 µg/ml en PBS pH 7,5	Sigma (P4170)
KU-55933	10 mM en DMSO	15 µM	Selleck (S1092)
Leupeptina	10 mg/ml en H <sub>2</sub> O	2 µg/ml	Sigma(L2884)
Mitosox	5 mM en DMSO	5 µM	Invitrogen (M36008)
MPA	100 mg/ml	50 mg/ml	Sigma (04103)
NAC	1 M en H <sub>2</sub> O	5 mM	Sigma (A7250)
<i>Nuclear Fast Red</i>	100%	100%	Sigma (N3020)
Oligo (dT) <sub>12-18</sub> Primer	0,5 µg/µl	0,5 µg	Invitrogen (18418-012)
Oligomicina	4 mg/ml en etanol	2 µg/ml	Sigma (O4876)
Paraquat	100 mM en H <sub>2</sub> O	100 µM	Sigma (85.617-7)
Penicilina/ Estreptomicina	10000 U/ml y 10000 µg/ml (100X)	100 U/ml y 100 µg/ml en DMEM, pH 7,35	Gibco-BRL (15140-122)
Pepstatin A	1 mg/ml en tampón HEPES pH 8.0	2 µg/ml	Sigma (P5318)
PFA		2% en PBS, pH 7,3	Sigma (15,812-7)
PMSF	100 mM en isopropanol	1mM	Sigma (P7626)
Polybreno	8 mg/ml en H <sub>2</sub> O	8 µg/ml	Sigma (H9268)
<i>ProLong Gold Antifade Reagent</i>	100%	100%	P36930 (Molecular Probes)

Reactivo	Disolución Stock	Concentración final	Proveedor y referencia
<i>Protein A Sepharose</i> ™ CL-4B	1 g en 4 ml TE pH8, 0,125 mg/ml BSA, 0,05 mg/ml <i>Salmon Sperm DNA</i> , 0,05% azidas sódica	100 µl/reacción	GE Healthcare (17-0780-01)
Puromicina	10 mg/ml	2 µg/ml	Sigma (7130)
RNAse A	10 mg/ml en 10 mM Tris HCl pH 7,5 y 15 mM NaCl	1 mg/ml en PBS pH 7,5	Roche (10109169001)
RNAse OUT, <i>Recombinant Ribonuclease Inhibitor</i>	40 U/µl	40 U	Invitrogen (10777-019)
Rotenona	0,1 mM en etanol	0,1 µM	Sigma (R8875)
SFB	100%	10 % en DMEM, pH 7,35	Gibco-BRL (10270-106)
<i>SuperScript</i> ™II <i>Reverse Transcriptase</i>	200 U/µl	1 U	Invitrogen (18064-014)
<i>SYBR</i> ® <i>Safe DNA gel stain</i>	10000X en DMSO	1X	Gibco-BRL (S33102)
T3 (triiodotironina)	1 mM en 40 mM NaOH	5 nM en cultivos celulares y 95 ng/g de ratón	Sigma (T2877)
T4 (tiroxina)	1 mM en 50 mM NaOH	25-30 ng/g de ratón	Sigma (T2376)
TdT (terminal deoxiribonucleótido transferasa)	30 U/µl	15 U	Promega (M1871)
TEAM	4 M	0,2 M	Sigma (90278)
<i>Tissue-Tek</i> ® <i>Cryomold Standard</i>			Sakura (4557)

Reactivo	Disolución Stock	Concentración final	Proveedor y referencia
<i>Tissue-Tek® OCT™ Compound</i>	100%	100%	Sakura (4583)
<i>TRI Reagent® Solution</i>	100%	100%	Applied Biosystems (AM9738)
<i>Trypan Blue</i>	0,4 %	0,2 %	Sigma (T8154)
$\alpha$ -Amanitina	1 mM en H <sub>2</sub> O	2,5 $\mu$ M	Sigma (A2263)
<i>Kits</i>	Proveedor	Referencia	
<i>BCA™ Protein Assay Kit</i>	Pierce	#23225	
<i>DAB (Peroxidase Substrate Kit)</i>	Vector Laboratories, Inc.	SK-4100	
Dual luciferase reporter assay system	Promega	E1910	
<i>ECL, Immun-Star™. HRP Luminol/Enhancer</i>	Bio-Rad	170-5040	
<i>Glutathione Assay Kit II</i>	Calbiochem	354103	
<i>OxiSelect™. 8-iso-Prostaglandin F2<math>\alpha</math> ELISA Kit</i>	Cell Biolabs, Inc	STA-337	
<i>Senescence Detection Kit</i>	BioVision	#K320-250	
Vectastain ABC Kit (Peroxidase Mouse IgG)	Vector Laboratories, Inc.	PK-4002	

Tabla I. Reactivos químicos y kits empleados en este trabajo.

Anticuerpo	Especie	WB	IF células	IHC	ChIP	Proveedor
8-OH-dG	Cabra (pAb)		1/200	1/100		NB600-1508 (Novus Biologicals)
ACTB (AC-15)	Ratón (mAb)	1/1000				A1978 (Sigma)
anti-cabra- IgG- AlexaFluor 488 (495/519 nm)	Burro		1/100			A11055 (Molecular Probes)
anti-cabra- IgG- AlexaFluor 594 (594/617 nm)	Burro		1/300			A11058 (Molecular Probes)
anti-cabra- IgG Biotina	Burro			1/400		705-065-147 (Jackson ImmunoResearch)
anti-conejo- IgG- AlexaFluor 488 (495/519 nm)	Cabra		1/100			A11034 (Molecular Probes)
anti-conejo- IgG- AlexaFluor 647 (650/670 nm)	Cabra		1/300			A21245 (Molecular Probes)
anti-IgG de conejo -HRP	Cabra	1/10000				sc-2004 (Santa Cruz Biotechnology)
anti-IgG de ratón-HRP	Cabra	1/10000				sc-2005 (Santa Cruz Biotechnology)

Anticuerpo	Especie	WB	IF células	IHC	ChIP	Proveedor
anti-ratón- IgG- AlexaFluor 488 (495/519 nm)	Cabra		1/100			A11029 (Molecular Probes)
anti-ratón- IgG- AlexaFluor 647 (650/670 nm)	Cabra		1/300			A21236 (Molecular Probes)
ATM	Cabra (pAb)				2 μg/reacción	ab2631
ATM (D2E2)	Conejo (mAb)	1/1000			2 μg/reacción	#2873 (Cell Signaling)
ATM Ser1981	Ratón (mAb)				2 μg/reacción	200-301-400 (Rockland)
ATM Ser1981	Ratón (mAb)	1/1000				#05-740 (Upstate)
Biotina-HRP	Ratón (mAb)		1/1000			A0185 (Sigma)
CBX3	Ratón (mAb)	1/500				MAB3450 (Millipore)
CCNA1 (H-432)	Conejo (pAb)		1/100			sc-75 (Santa Cruz Biotechnology)
CDKN2A (M- 156)	Ratón (mAb)	1/1000				sc-1207 (Santa Cruz Biotechnology)
CHEK1 Ser317	Conejo (pAb)	1/1000				AF2054 (R&D Systems)
CHEK2 Ser19	Conejo (pAb)	1/1000				#2666 (Cell Signaling)

Anticuerpo	Especie	WB	IF células	IHC	ChIP	Proveedor
H3F3A acetil K9 ChIP Grade	Conejo (pAb)				1 µg/reacción	Ab4441 (Abcam)
H3F3A ChIP Grade	Conejo (pAb)				1 µg/reacción	Ab1791 (Abcam)
H3F3A K9 3me	Conejo (pAb)	1/1000				#07-442 (Millipore)
NRF1	Conejo (pAb)	1/1000			4,6 µg/reacción	ab34682 (Abcam)
PRKAA	Conejo (pAb)	1/1000				#2532 (Cell Signaling)
PRKAA Thr172 (40H9)	Conejo (mAb)	1/1000				#2535 (Cell Signaling)
THRA (FL-408)	Conejo (pAb)	1/1000				sc-772 (Santa Cruz Biotechnology)
THRB	Conejo (mAb)	1/500				600-401-A96 Rockland
THRB	Conejo (pAb)				2 µls/ reacción	Cedido por el Dr. Laurent Sachs
THRB (J51)	Ratón (mAb)	1/1000				sc-737 (Santa Cruz Biotechnology)
TP53	Conejo (pAb)	1/1000				NCL-p53-CM5p (Novocastra)
TP53 Ser15	Conejo (pAb)	1/1000				#9284S (Cell Signaling)
TP53BP1 (P53 binding protein)	Conejo (pAb)		1/1000	1/1000		NB100-304 (Novus Biologicals)
TUBA1A(clon DM1A)	Ratón (mAb)	1/2000				T1699 (Sigma)

Anticuerpo	Especie	WB	IF células	IHC	ChIP	Proveedor
$\gamma$ H2AFX (Ser 139) (clon JBW301)	Ratón (mAb)	1/1000	1/1000	1/200		#05-636 (Millipore)

**Tabla II. Anticuerpos empleados.** WB: western blot; IF: inmunofluorescencia; IHC: inmunohistoquímica; ChIP: inmunoprecipitación de cromatina.

### 3.-Plásmidos y transfecciones.

#### 3.1.-Transfecciones estables.

Para la expresión constitutiva de los receptores de hormonas tiroideas se utilizó el sistema de transducción retroviral pLPCX de Invitrogen. Este plásmido expresa un transcrito que contiene la señal de empaquetamiento viral  $\Psi^+$ , el gen de resistencia al antibiótico puromicina y el gen de interés. Por otro lado, el plásmido pCL-Eco (cedido por Dr. Ignacio Palmero, IIBM, Madrid), proporcionó las proteínas virales *gag*, *env* y *pol*, que son necesarias para la formación y replicación del virus. Se utilizaron los plásmidos pLPCX-THRA y pLPCX-THRB que expresan los receptores THRA $\alpha$ 1 de pollo y THR $\beta$ 1 humano, respectivamente (88), para generar líneas estables de varios tipos celulares de ratón. También se crearon por mutagénesis dirigida diferentes mutantes de pLPCX-THRB. Para generar las líneas estables, 10  $\mu$ g pLPCX-THRA, pLPCX-THRB o sus diferentes mutantes y 10  $\mu$ g del plásmido pCL-Eco se transfectaron en células 293T (20-30% confluencia) en placas de 90 mm (Falcon, Becton Dickinson), mediante el método del  $\text{CaPO}_4$  (318). Después de 16 h.p.t., las placas (3 por transfección), se lavaron con PBS y se añadieron 8 ml de medio de cultivo fresco. Después de 24 horas, los sobrenadantes de los triplicados se recogieron y se filtraron por un filtro de 0,45  $\mu$ m de diámetro de poro (Acrodisc® 25mm Syringe Filter, Pall Corporation), se llevaron a un volumen final de 24 ml con medio fresco y se añadió polibreno a una concentración final de 8  $\mu$ g/ml. El sobrenadante se usó para infectar por duplicado los distintos cultivos de fibroblastos de ratón creciendo en placas de 150 mm (Falcon, Becton Dickinson) (60-70 % de confluencia). Después de 24 h.p.i., las células se recogieron por tripsinización y se sembraron diluidas 1/2 en nuevas placas con medio de cultivo que contenía 2  $\mu$ g/ml del agente de selección puromicina. De la misma forma se generaron cultivos estables a partir del vector retroviral pWLZ-Ras (cedido por el Dr. Ignacio Palmero) que codifica por la forma oncogénica (Val<sup>12</sup>) del gen *RAS* humano (*HRAS*). En este caso, se usó higromicina a 75  $\mu$ g/ml como agente de selección, durante 5 días.



### 3.2.-Transfecciones transitorias.

En los ensayos de transactivación transcripcional mediada por el receptor de las hormonas tiroideas, empleamos las células 293T o bien los cultivos estables generados en los diversos sistemas celulares de ratón. En el caso de las células 293T se sembraron, por triplicado, 300.000 células por pocillo de placas MW6 (Falcon, Becton Dickinson) en medio deplecionado de hormonas tiroideas. Al día siguiente fueron transfectadas por el método del  $\text{CaPO}_4$  con el vector reportero pTK-DR4-Luciferasa, que contiene el ADNc del gen reportero luciferasa clonado 3' del promotor de la timidina quinasa al que se ha fusionado el elemento prototípico de respuesta a T3 (TRE) (154), el plásmido reportero pRL-TK-Renilla (Promega) y los vectores de expresión del receptor pSG5-THRB o pcDNA3-flagATM humano (cedido por el Dr. Fernández-Capetillo, CNIO, Madrid). Las mezclas de transfección contenían 250 ng de cada uno de los plásmidos reporteros, 500 ng de pSG5-TR $\beta$  y 200 ng de pcDNA3-flagATM. Los vectores de expresión vacíos (pSG5 o pcDNA3) se añadieron a las mezclas de transfección para igualar la cantidad de ADN en todos los pocillos. Después de 5 h.p.t., los pocillos se lavaron una vez con PBS (2 ml) y se añadieron 3 ml de medio deplecionado con o sin T3 a una concentración final de 5 nM. Después de 16 horas, se lavaron los cultivos con PBS frío, se levantaron las células mediante el raspado del pocillo, y se recogieron en tubos Eppendorf de 1,5 ml tras un pulso de 10 s en una microcentrífuga. El sedimento de células se procesó para la medición de la actividad luciferasa y renilla mediante el *dual luciferase reporter assay system* (Promega) en un luminómetro GLOMAX de Promega. La actividad luciferasa de los extractos se normalizó en función de la actividad Renilla (Luc/Renilla) o por la cantidad de proteína presente en los extractos. En el caso de los fibroblastos de ratón, se sembraron por triplicado 500.000 células por pocillo de placas MW6 y se transfectaron con *Lipofectamine-2000* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las mezclas de transfección contenían 250 ng pTK-DR4-luc, 250 ng pRL-TK-Renilla y 4,8  $\mu\text{l}$  de *lipofectamine 2000* (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) por pocillo.

### 3.3.-Plásmidos.

#### **- Plásmidos reporteros**

**pTK-DR4-luc:** Este plásmido expresa el ADNc del gen reportero luciferasa bajo el control del promotor TK. En posición 5' del promotor TK, contiene el elemento de respuesta a T3 (TRE) compuesto por dos hemisitios separados por cuatro pares de bases (bp). Este vector ha sido cedido por el Dr. A. Baniahmad (Genetic Institute, Germany).

**pRL-TK-Renilla:** Este plásmido expresa el gen testigo luciferasa de *Renilla reniformes* bajo el control del promotor de TK (Promega). Este vector ha sido cedido por el Dr. A. Baniahmad (Genetic Institute, Germany).

#### **- Vectores de expresión**

**pLPCX:** Es un plásmido de expresión retroviral (Invitrogen) que contiene las secuencias LTRs que flanquean la señal de empaquetamiento viral  $\Psi^+$ , el gen de resistencia al antibiótico puromicina (Puro<sup>r</sup>) y un sitio de multiclonaje (MCS) delante del promotor de citomegalovirus ( $P_{CMVIE}$ ). Este plásmido ofrece la posibilidad de expresar el gen de interés insertado en el MCS y de forma transitoria o estable, una vez integrado.

**pLPCX-THRB:** Es un plásmido derivado del pLPCX que expresa el ADNc del receptor THR $\beta$ 1 humano. Se obtuvo a partir de la digestión del plásmido pSG5-THRB con la enzima de restricción EcoRI, y la inserción del fragmento obtenido en el sitio EcoRI del MCS del vector vacío pLPCX (88).

**pLPCX-THRB E452Q:** Este plásmido contiene el ADNc del receptor THR $\beta$ 1 humano con la mutación E452Q en la hélice 12 del LBD. Se obtuvo por mutagénesis dirigida empleando como molde de la reacción pLPCX-THRB y los cebadores 5' CCC CCC TTT GTT CCT GCA AGT GTT CGA GG 3' y 5' CCT CGA ACA CTT GCA GGA ACA AAG GGG GG 3'.

**pLPCX-THRB AHT:** Este plásmido contiene el ADNc del gen del receptor THR $\beta$ 1 humano en el que se sustituyó los residuos Ala223, His224, y Thr227 por Glu223, Glu224 y Ala227 (121). Se obtuvo por mutagénesis dirigida empleando como molde de la reacción pLPCX-THRB y los cebadores 5' AAA ACT GTC ACC GAA GGC GGT GTG GCG GCC AAC GCC CAA GGC 3' Y 5' GCC TTG GGC GTT GGC CGC CAC ACC GCC TTC GGT GAC AGT TTT 3'.

**pLPCX-THRB C102G:** Este plásmido contiene el ADNc del gen del receptor THR $\beta$ 1 humano en el que se ha introducido la mutación C120G que impide la unión del receptor al ADN. Se obtuvo por mutagénesis dirigida empleando como molde de la reacción pLPCX-THRB y los cebadores 5' CAA GGA CGA GCT CGG TGT AGT GTG TGG TGA CAA AGC C 3' y 5' GGC TTT GTC ACC ACA CAC TAC ACC GAG CTC GTC CTT G 3'.

El protocolo utilizado para generar las mutaciones fue el proporcionado por el manual de instrucciones de la *Pfx platinum polymerase* (Stratagene, catálogo 600153-82). El producto de PCR se incubó durante una hora con la endonucleasa para ADN metilado y hemimetilado DpnI (Invitrogen, catálogo 15242-019) y posteriormente, se transformó en la cepa DH5 $\alpha$  con el

ADN resultante. La obtención de los plásmidos con las mutaciones se confirmó mediante la secuenciación de los mismos.

**pLPCX-THRA:** Es un plásmido derivado del pLPCX que expresa el ADNc del gen del receptor  $\text{THR}\alpha 1$  de pollo. Se obtuvo a partir de la digestión del plásmido pSG5-THRA con la enzima de restricción EcoRI, y posterior inserción del fragmento obtenido en el sitio EcoRI del vector pLPCX.

**pWZL-Ras:** Vector de expresión retroviral que expresa el ADNc de la forma mutada ( $\text{Val}^{12}$ ) del gen *RAS* humano (*HRAS*). Este plásmido expresa el gen de resistencia al antibiótico higromicina y fue cedido por el Dr. Ignacio Palmero (IIBM, Madrid).

**pCL-Eco:** Vector de expresión que codifica las proteínas virales *gag*, *env* y *pol* necesarias para la formación y empaquetamiento retroviral. Los retrovirus obtenidos con este plásmido presentan un tropismo por células de rata y ratón pero no humanas. Este plásmido ha sido cedido por el Dr. Ignacio Palmero (IIBM, Madrid).

**pcDNA3-flagATM:** Vector de expresión que contiene el ADNc del epítipo *flag* fusionado al ADNc del gen *ATM* humano. Este vector ha sido cedido por el Dr. Óscar Fernández-Capetillo (CNIO, Madrid).

**pSG5-THRB:** Este plásmido contiene el ADNc del gen del receptor  $\text{THR}\beta 1$  humano.

**pSG5:** Vector de expresión eucariótico que contiene el promotor temprano y la señal de poliadenilación del virus SV40.

**pcDNA3:** Vector de expresión eucariótico que contiene el promotor del citomegalovirus ( $P_{\text{CMV IE}}$ ).

### 4.-Western-blotting (Inmunotransferencia).

Para obtener extractos totales de proteínas, las células se lavaron una vez con PBS frío que contenía los inhibidores de proteasas PMSF (1 mM), aprotinina (2  $\mu\text{g/ml}$ ), pepstatina A (2  $\mu\text{g/ml}$ ) y leupeptina (2  $\mu\text{g/ml}$ ). A continuación, las células se lisaron con el tampón de lisis con triple detergente (250) (50mM Tris-HCl pH 8,0; 150mM NaCl; 0,02% azida sódica; 0,1% SDS; 1% NP-40; 0,5% deoxicolato sódico), suplementado con inhibidores de proteasas PMSF (100  $\mu\text{g/ml}$ ), 2  $\mu\text{g/ml}$  de pepstatina A, 2  $\mu\text{g/ml}$  de aprotinina, 2  $\mu\text{g/ml}$  de leupeptina y 1% de un *cocktail* de inhibidores de fosfatasa (Sigma). Posteriormente, los lisados proteicos se mantuvieron en hielo durante un periodo de 15-20 minutos, tras lo cual se centrifugaron a 13.000 rpm a 4°C durante 10 minutos y los sobrenadantes se conservaron a -80°C hasta su

análisis por *Western-blotting*. La concentración de proteína del extracto se evaluó en triplicados de las muestras mediante el BCA<sup>TM</sup> *Protein Assay Kit* (Pierce) y un lector de ELISA (VersaMax, Molecular Devices). Las proteínas se analizaron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE que se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro (Protran® BA 83/85, Perkin Elmer). Las membranas se incubaron durante 1 hora a RT con solución de bloqueo (3% albúmina bovina sérica, BSA, Sigma) en PBS-0,05% Tween-20 (PBST) o 5% leche desnatada-PBST y a continuación se incubaron ON a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo. Las membranas se lavaron dos veces, 5 minutos, con PBST y se incubaron a continuación 1 hora a RT con el anticuerpo secundario diluido 1/10.000 en PBST. Después se volvieron a lavar tres veces, durante 5 minutos, con PBST. El revelado se realizó con el sistema de quimioluminiscencia mejorada (ECL, *Immun-Star*<sup>TM</sup>. *HRP Luminol/Enhancer*, Bio-Rad), según las instrucciones del proveedor. Las imágenes se cuantificaron con el *software Image J*.

## 5.-Inmunofluorescencia indirecta de células.

Para este tipo de ensayo empleamos portaobjetos de cristal con 8 pocillos proporcionados por Nunc (Thermo Scientific, catálogo 177402). En estos pocillos se sembraron 15.000-20.000 células/pocillo y se siguió el protocolo descrito por T. Jenuwein (258) para la inmunofluorescencia de proteínas nucleares. Las células se fijaron durante 10 min con paraformaldehído al 2%, se lavaron con PBS y se permeabilizaron durante 5 min con solución de permeabilización (0,1% Tritón X-100 y 0,1% citrato de sodio). A continuación se lavaron 20 min con PBS y solución RINSE (PBS/ 0,25% BSA/ 0,1% Tween-20) y se bloquearon 30 min con solución de bloqueo (solución RINSE, 2,5 % BSA). Los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo se incubaron en una cámara de humedad ON a RT. Después de esta incubación, se hicieron dos lavados de 10 min con RINSE (PBS/ 0,25% BSA/ 0,1% Tween-20). Los anticuerpos secundarios conjugados con diferentes fluorocromos se prepararon en solución de bloqueo y se incubaron durante 1 hora en una cámara de humedad a RT. Finalmente, las células se incubaron 10 min con Dapi (Molecular Probes), se lavaron con PBS y los portaobjetos se montaron con cubreobjetos y *ProLong* (Molecular Probes). Las imágenes se capturaron con el microscopio de fluorescencia Nikon E90i utilizando en cada caso los filtros adecuados y el *software NES Elements* (Nikon). Por otro lado, el análisis de la cofocalización nuclear se analizó utilizando un microscopio confocal espectral LSM710 (Zeiss) (objetivo 63X/1,4 Plan-ApoCHROMAT), usando láseres de Argón (488 nm), HeNe (543 nm) y diodo violeta (405 nm). Las imágenes en este caso fueron obtenidas con el *Software Zeiss ZEN2009*. Cada canal fue grabado independientemente y las imágenes de pseudocolor fueron generadas y superpuestas. Para la cuantificación de los focos de daño genómico se contabilizaron más de

200 núcleos por cada una de las condiciones experimentales. Para el análisis de NRF1, las células se fijaron 5 min con metanol (-20°C) y 30 s con acetona (-20°C). La solución de bloqueo consistió en 1% BSA y los lavados se llevaron a cabo con PBS.

### 6.-Roturas físicas en el ADN.

Para detectar roturas en el ADN desarrollamos un método basado en la incorporación de dUTP por la transferasa terminal (TdT) y su posterior detección inmunocitoquímica. Los MEFs TP53KO se sometieron a tres pases consecutivos en presencia o ausencia de T3 (5nM) (5000 células/pocillo de portaobjetos). Las células se fijaron con PFA al 2% durante 10 min. y se permeabilizaron con el tampón de permeabilización (ver apartado de inmunofluorescencia indirecta de células). Después de un lavado con PBS 1X durante 5 min., se incubaron con 50 µl de mezcla de reacción de la enzima TdT (Promega, M1871) que contenía 1 µl de dUTP-11-biotina 1mM (Thermo Scientific, #R0081) a 37°C/ON. Después de este tiempo se lavaron con PBS 1X/5 min. y se incubaron con anticuerpo anti-biotina-HRP (1/1000; Sigma, A0185) durante 1 hora/RT. A continuación, se reveló utilizando el sistema DAB de Vector Lab (SK-4100) y se tiñeron los núcleos con Nuclear Fast Red (Sigma, N3020), como se hizo en los ensayos inmunohistoquímicos. Como control positivo las células se sometieron a un shock de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (600 µM) durante 2 horas. Las fotografías fueron tomadas utilizando el microscopio *Nikon E90i* y el *software NES Elements* (Nikon).

### 7.-Extracción de ARN y RT-PCR en tiempo real.

Para la extracción de ARN total se utilizó el reactivo *TriReagent* (Gibco) basado en el método del isotiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo. La concentración de ARN se estimó en un espectrofotómetro Nanodrop ND1000 y las muestras fueron conservadas a -80°C en agua MiliQ. Para la síntesis de ADNc utilizamos el *SuperScript<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System* de Invitrogen siguiendo las instrucciones del proveedor. Para cada reacción, empleamos 1 µg de ARN total tratado con DNase I y 500 ng de oligo dT (Invitrogen). El producto final de la reacción se llevó a un volumen final de 60 µl.

Las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron utilizando el sistema basado en *Sybr Green (FastStart Universal SYBR Green Master (ROX))* (Roche) en el termociclador Mx3500P de Stratagene. Para cada reacción empleamos 2 µl de ADNc y una mezcla de reacción que contenía 0,3 µM de cada oligonucleótido, *FastStar Taq DNA polymerase*, tampón de reacción, dNTPs, SYBR Green y el fluorocromo ROX, en un volumen final de reacción de 25 µl. Las condiciones de PCR consistieron en una primera fase de

desnaturalización de 95°C/10 min, seguida de 95°C/ 30 s para la desnaturalización, y 60°C/ 1 min para el anillamiento y elongación del producto durante cuarenta ciclos . A continuación se realizó la adquisición de la fluorescencia de los productos sometidos a un gradiente creciente de temperatura [95°C/ 1 min, gradiente (55°C-95°C)].

Gen	Secuencia	Tamaño del producto de amplificación
<i>Catalasa</i> D	5' GCA TGC ACA TGG GGC CAT CA 3'	261 pb
<i>Catalasa</i> R	5' ACC CTC TTA TAC CAG TTG GC 3'	(+923/+1184)
<i>Cox10</i> D	5' CTT TCG ACT GGT CCT GCT TC 3'	222 pb
<i>Cox10</i> R	5' GAT TCA CTC CCC AGG TCA GA 3'	(+545/+767)
<i>Dio1</i> D	5' GTT GAA CTT TGG CAG TTG CAC 3'	88 pb
<i>Dio1</i> R	5' GGC TGT GGA GGC AAA GTC ATC 3'	(+353/+442)
<i>Gapdh</i> D	5' ACA GTC CAT GCC ATC ACT GCC 3'	266 pb
<i>Gapdh</i> R	5' GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG 3'	(+523/+789)
<i>Gpx1</i> D	5' TTC CGC AGG AAG GTA AAC AGC 3'	255 pb
<i>Gpx1</i> R	5' GTC TCT CTG AGG CAC GAT CCG 3'	(+132/+387)
<i>Mt-co1</i> D	5' GCC TTT CAG GAA TAC CAC GA 3'	226 pb
<i>Mt-co1</i> R	5' AGG TTG GTT CCT CGA ATG TG 3'	(+1295/+1521)
<i>Mt-cyb</i> D	5' ATT CCT TCA TGT CGG ACG AG 3'	228 pb
<i>Mt-cyb</i> R	5' ACT GAG AAG CCC CCT CAA AT 3'	(+282/+510)
<i>Nrf1</i> D	5' TGA GGT CGA ATG GTA TGT GG 3'	156 pb
<i>Nrf1</i> R	5' AGG ACT GAA AGC AGC GTC TC 3'	(+123/+279)
<i>Ppargc1a</i> D	5' AAT GCA GCG GTC TTA GCA CT 3'	207 pb
<i>Ppargc1a</i> R	5' TTT CTG TGG GTT TGG TGT GA 3'	(+473/+680)
<i>Ppargc1b</i> D	5' TTG TAG AGT GCC AGG TGC TG 3'	220 pb
<i>Ppargc1b</i> R	5' GAT GAG GGA AGG GAC TCC TC 3'	(+2756/+2876)
<i>Rac1</i> D	5' TAT GGG ACA CAG CTG GAC AA 3'	152 pb
<i>Rac1</i> R	5' ACA GTG GTG TCG CAC TTC AG 3'	(+164/+316)
<i>Sco1</i> D	5' CCC AAA ACC GAC AAG GAC TA 3'	173 pb
<i>Sco1</i> R	5' TCT GGG TCA ATG GTG ATG AA 3'	(+394/+567)
<i>Slc25a4</i> D	5' GGA TTC TCA CGA CAC AAT CAA TG 3'	151 pb
<i>Slc25a4</i> R	5' TTC CTG GCA GGT GGC ATC G 3'	(+34/+185)
<i>Sod1</i> D	5' TGA GGT CCT GCA CTG GTA AC 3'	118 pb
<i>Sod1</i> R	5' CAA GCG GTG AAC CAG TTG TG 3'	(+76/+194)
<i>Sod2</i> D	5' ATC TGT AAG CGA CCT TGC TC 3'	228 pb
<i>Sod2</i> R	5' GCC TGC ACT GAA GTT CAA TG 3'	(+255/+483)
<i>Tfam</i> D	5' CCA AAA AGA CCT CGT TCA GC 3'	211 pb
<i>Tfam</i> R	5' CTT CAG CCA TCT GCT CTT CC 3'	(+4607/+671)
<i>Thrb</i> D	5' AGC TGA AAA ATG GGG GTC TT 3'	255 pb
<i>Thrb</i> R	5' TCA CGT GGT GTT TTC GGT AA 3'	(+1019/+1243)
<i>Ucp2</i> D	5' CAC TAC GTT CCA GGA TCC CAA G 3'	101 pb
<i>Ucp2</i> R	5' CAG GTC ACT GTG CCC TTA CCA T 3'	(+1118/+1219)
<i>Ucp3</i> D	5' AGA TTC CCG CAG TAC CTG GAC T 3'	101 pb
<i>Ucp3</i> R	5' GGA TTT GTG CCC TCC TTT CTG 3'	(+811/+912)
<i>Uqcrrs1</i> D	5' TGG TCT CCC AGT TTG TTT CC 3'	172 pb
<i>Uqcrrs1</i> R	5' GCA GCT TCC TGG TCA ATC TC 3'	(+395/+567)

**Tabla III.** Secuencia de los cebadores empleados para los ensayos de RT-qPCR en tiempo real. D, *directo*; R, *reverso*.

La secuencia de los cebadores para los genes *Sod1*, *Sod2*, *Gpx1*, *Ucp2*, *Ucp3*, *Catalasa* y *Slc25a4* han sido publicadas previamente (275).

Símbolo del Gen (nomenclatura <i>HUGO</i> )	Número de acceso <i>NCBI</i>
<i>Catalase</i>	NM_009804
<i>Cox10</i>	NM_178379
<i>Dio1</i>	NM_007860
<i>Gapdh</i>	NM_008084
<i>Gpx1</i>	NM_008160
<i>Mt-co1</i>	JF286601 (genoma mitocondrial)
<i>Mt-cyb</i>	JF286601 (genoma mitocondrial)
<i>Nrf1</i>	NM_001164226
<i>Ppargc1a</i>	NM_008904
<i>Ppargc1b</i>	NM_133249
<i>Rac1</i>	NM_009007
<i>Sco1</i>	NM_001040026
<i>Slc25a4</i>	NM_007450
<i>Sod1</i>	NM_011434
<i>Sod2</i>	NM_013671
<i>Tfam</i>	NM_009360
<i>Thrb</i>	NM_000461
<i>Ucp2</i>	NM_011671
<i>Ucp3</i>	NM_009464
<i>Uqcrrf1</i>	NM_025710

**Tabla IV.** Número de acceso de cada gen en la base de datos del *NCBI*.



## 8.-Evaluación de la proliferación celular. Cálculo de PDLs.

El análisis de la proliferación celular en MEFs se llevó a cabo siguiendo el protocolo 3T3 (293). Para ello, se sembraron, por triplicado, 360.000 células en placas de 60 mm de diámetro y se mantuvieron en cultivo 3 días. Después de una tripsinización de dos minutos/37°C con 1 ml de tripsina, se neutralizaron con 5 ml de medio y se contaron usando un hemotocitómetro *Neabuer*. El mismo número de células se sembró de nuevo, repitiendo el proceso tres días después. La estimación de la capacidad de proliferación del cultivo se determinó mediante el cálculo de los PDLs (*Population Doublings Levels*) acumulados en cada pase, aplicando la fórmula  $PDL = \log(N_f / N_0) * 3,33$ , donde  $N_0$  es el número de células sembradas y  $N_f$  es el número de células obtenidas después de 3 días en cultivo. La viabilidad de las células se determinó mediante la exclusión del colorante *trypan blue* o por citometría de flujo. Este protocolo fue modificado en función de la capacidad proliferativa de los distintos MEFs. Así, en el caso de los MEFs ATMKO, la densidad celular fue de 250.000 células/placa de 60 mm de diámetro.

## 9.-Ensayo de la actividad $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia celular (SA- $\beta$ gal).

Para este ensayo utilizamos el *Senescence Detection Kit*, de *BioVision*. Este método está basado en la actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia celular, detectable a pH 6.0 y que permite la identificación de células senescentes en cultivos celulares y en preparaciones de tejido de mamíferos (60). Se sembraron 25.000 ó 50.000 células/pocillo en placas de 12 pocillos (MW-12, Falcon), en los tiempos indicados en cada ensayo. Al día siguiente, se fijaron las células siguiendo las instrucciones del proveedor y se incubaron a 37°C en la oscuridad durante 24 horas con el substrato X-gal. Finalmente, se realizaron micrografías con un microscopio Nikon modelo TS 100F acoplado a una cámara digital Nikon modelo DS-L1 y las imágenes se procesaron con el programa Adobe Photoshop CS3. Se cuantificó el número de células "azules" presentes (células  $\beta$ gal<sup>+</sup>), analizando más de 200 células por condición experimental.

## 10.-Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Para estos experimentos utilizamos las condiciones y los reactivos del *kit* proporcionado por UPSTATE (número de catálogo: 17-295). Las células se sembraron en placas de 150 mm ( $3,85 \times 10^6$ , Falcon, Becton Dickinson) y al día siguiente se trataron con 2,5  $\mu$ M  $\alpha$ -amanitina (Sigma) en DMEM sin suero, durante 2,5 horas. Las células se lavaron con 40 ml de DMEM sin suero y se trataron con T3 (5 nM) durante 1 hora. A continuación se fijaron con 1%



formaldehído durante 15 minutos a 37°C. Las células se lavaron con PBS frío que contenía inhibidores de proteasas y se recogieron mediante raspado de la placa y centrifugación a 2.000 rpm a 4°C durante 5 minutos. El sedimento celular fue lisado con 300 µl de tampón de lisis (1% SDS; 10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml pepstatina A y 2 µg/ml leupeptina) durante 15 minutos a 0°C. La sonicación se realizó en un sonicador Bioruptor UCD-200TM (Diagenode, Liège, Bélgica), siguiendo las instrucciones del proveedor. Para cada reacción de inmunoprecipitación se usaron de 2-3,0x10<sup>6</sup> de células y las cantidades de anticuerpos que se detallan en el apartado 2 (Tabla 1) (251). El ADN inmunoprecipitado fue purificado mediante dos ciclos de fenol/cloroformo y precipitado ON con etanol a -80°C. Los sedimentos se resuspendieron en 30 µl de H<sub>2</sub>O y se diluyeron 1/2 para amplificar el ADN mediante PCR con oligonucleótidos sintéticos diseñados específicamente para las diferentes áreas de los promotores correspondientes (tabla V). Las condiciones de la PCR fueron 95°C/5 min, 35-37 ciclos de (95°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/1 min) y un ciclo de elongación final de 72°C/10 min. En las reacciones de PCR se incluyeron las muestras correspondientes al material de partida (*inputs*) de cada una de las condiciones experimentales, obtenidas tras la sonicación. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa 2%-TAE conteniendo el fluorocromo *SYBR safe* (Gibco-BRL).

Gen (posición respecto al inicio de transcripción)	Secuencia
<i>Tfam</i> -638 D	5' CCA TCA AGC TGG GTT CAG TT 3'
<i>Tfam</i> -477 R	5' GCC TGG CAA GCT GAG TTC TA 3'
<i>Tfam</i> -547 D	5' GGG CAA CTT GTT TGA GTT GG 3'
<i>Tfam</i> -354 R	5' GAA AGC CCA CAA GGC TAC TG 3'
<i>Tfam</i> -373 D	5' CAG TAG CCT TGT GGG CTT TC 3'
<i>Tfam</i> -131 R	5' TGG TCT AAG GTG GGT GTT GC 3'
<i>Tfam</i> -150 D	5' GCA ACA CCC ACC TTA GAC CA 3'
<i>Tfam</i> +78 R	5' ATA CGG TGC CTA TGG ACT GC 3'
<i>Uqcrfs1</i> -166 D	5' CCG AGT CAG ACA CCA GAG TG 3'
<i>Uqcrfs1</i> +211 R	5' GTC GCT TCA CAT CCA GAA CA 3'

**Tabla V.** Secuencia de los cebadores utilizados en los ensayos de ChIP.

## 11.- Irradiación de células con rayos $\gamma$ .

Para el análisis de la reparación del ADN post-radiación empleamos un irradiador que dispone de dos fuentes encapsuladas de  $^{137}\text{Cs}$  de 14,8 TBq (400 Ci) cada una, incorporadas en el interior del equipo (Sherpherd Associates, Marck-1-30A). Las células fueron irradiadas con 3 Gy y analizadas a distintos tiempos post-radiación mediante inmunofluorescencia. Para determinar la viabilidad celular post-radiación, las células fueron irradiadas con 10 Gy y sometidas al protocolo 3T3 durante tres pases consecutivos.

## 12.-Medición de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).

Para la medición de especies reactivas de oxígeno (ROS) usamos la sonda 2', 7' diclorofluoresceína diacetato ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , Sigma) y el fluorómetro (*Synergy HT Microplate Reader*, BioTek Instruments). Las células se sembraron por cuadruplicado en placas de 24 pocillos (150.000 células/pocillo), y se trataron con T3 a los tiempos indicados en cada caso. Posteriormente, se lavaron con PBS y se lisaron con 100  $\mu\text{l}$  del tampón de lisis proporcionado en el *Dual luciferase kit* (Promega). En placas opacas de 96 pocillos (Falcon, Becton Dickinson, catálogo 353376) se añadieron 60  $\mu\text{l}$  de cada extracto y la sonda fluorescente a una concentración final de 20  $\mu\text{M}$ . La oxidación de la sonda se analizó cada 2 minutos durante 1 hora a 37°C usando los filtros adecuados (Excitación/emisión 485/20 nm /528/20 nm). Las medidas de fluorescencia en cada punto fueron normalizadas en función de la concentración de proteína de cada uno de los extractos. Como control positivo utilizamos células tratadas con 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 2 horas.

Para el análisis de ROS de origen mitocondrial empleamos la sonda *Mitosox* (Excitación/emisión: 510nm/580nm, Invitrogen) y citometría de flujo. Las células se sembraron en placas MW6 (150.000/pocillo) y se incubaron al día siguiente con 5  $\mu\text{M}$  de *Mitosox* durante 30 minutos en oscuridad, después de los tratamientos correspondientes. Como control positivo del ensayo utilizamos el reactivo *Paraquat* (0,1 mM) que genera radicales superóxido. Los controles se prepararon incubando las células con *Mitosox* durante 10 minutos y a continuación una hora con *Paraquat* en ausencia de suero. Después se retiró el medio y se incubó una vez más con *Mitosox* durante 30 minutos como el resto de las muestras. Después de la incubación con *Mitosox*, todas las muestras se lavaron con PBS, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de tripsina y después de unos minutos se añadieron 250  $\mu\text{l}$  de medio, se resuspendieron las células y se transfirieron a una placa de 96 pocillos. La adquisición y análisis de las muestras se llevaron a cabo en un citómetro de flujo BD *FACSCanto II* y con el software *FACSDiva*.

### 13.- Medición de glutatión oxidada (GSSG) en extractos celulares.

La medición del nivel de oxidación proteica en extractos celulares se llevó a cabo mediante el *Glutathione assay Kit II* de Calbiochem siguiendo las instrucciones del proveedor. Las células de los distintos grupos experimentales se colectaron por raspado de la placa y centrifugación, y el sedimento celular obtenido se homogeneizó en 0,5 ml de tampón MES 1X (200 mM ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; 50 mM fosfato; 1 mM EDTA, pH 6,0). A continuación, las muestras se sonicaron y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min. a 4°C. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron con ácido metafosfórico (50 mg/ml; MPA, Sigma) durante 5 min y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 min. Se añadieron 50 µl/muestra de 4M TEAM (trietanolamina, Sigma) y 10 µl de 1M 2-vinilpiridina (Sigma). Las muestras se incubaron a RT durante 60 min, se añadió la mezcla de ensayo (1X MES, mezcla de cofactores y mezcla de enzimas) y se midió la absorbancia a 405 nm a intervalos de 5 minutos durante 30 minutos en un espectrofotómetro *VersaMax* (Molecular Devices). La concentración de GSSG se determinó siguiendo las instrucciones del proveedor, a partir de las muestras patrón de GSSG proporcionadas. Este ensayo se repitió dos veces a partir de triplicados de muestras independientes.

### 14.- Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.

Para el análisis del ciclo celular usamos la tinción con ioduro de propidio y el citómetro de flujo BD FACScan (Becton Dickinson). Para ello, se utilizaron triplicados de placas. Las células se recogieron por tripsinización y se neutralizaron con medio. Se contaron las células y  $1 \times 10^6$  células se sedimentaron en tubos adecuados para FACS (Falcon, Becton Dickinson, catálogo 2052), con sus correspondientes sobrenadantes. A continuación, se añadieron 100 µl de PBS a los sedimentos celulares, se resuspendieron ligeramente y se añadieron 3 ml de etanol 70% (-20°C), gota a gota, para evitar la formación de agregados celulares. Las células se fijaron durante al menos 1 hora a 4°C y se lavaron posteriormente dos veces con PBS. Los sedimentos celulares se incubaron durante al menos 30 minutos con ioduro de propidio 50 µg/ml y RNase A 1 mg/ml. Las muestras se adquirieron en el citómetro usando el *software Cell Quest Pro*. Los datos adquiridos fueron analizados con el *software Modfit 3.1* y las ilustraciones de perfiles de ADN fueron obtenidos con el *software FlowJo*.

### 15.- Medida de la capacidad respiratoria celular.

Para medir el consumo de oxígeno en células intactas utilizamos el *OROBOROS Oxygraph-2k* (Oroboros Inst., Innsbruck, Austria) (125). Este aparato, un respirómetro de alta

resolución, nos permite monitorizar la función respiratoria mitocondrial y celular. Permite detectar diferencias muy pequeñas en los niveles de consumo de oxígeno, partiendo de una cantidad de muestras relativamente pequeña, algo que no es posible con los métodos de medida convencionales tipo electrodo de Clark.

Los análisis realizados se llevaron a cabo en grupos de dos a partir de  $1 \times 10^6$  de células procedentes de cultivos sembrados a una densidad celular idéntica, resuspendidas en 2 ml de DMEM. Las células se dispusieron en las dos cámaras del aparato y el protocolo que se llevó a cabo de forma secuencial, incluye una medida de la respiración celular routine (Cr) que refleja la actividad metabólica aeróbica en las condiciones de cultivo rutinarias con los sustratos fisiológicos en el medio, la respiración tras inhibir la ATP sintasa con oligomicina ( $2 \mu\text{g/ml}$ ), que es causada principalmente por la compensación de la fuga de protones e incluye la respiración no mitocondrial de la célula (CrO); la máxima capacidad respiratoria obtenida al desacoplar la respiración mitocondrial añadiendo FCCP en cantidades crecientes ( $0,5 \mu\text{M}$  cada vez) (CrU); y por último, se mide la respiración no mitocondrial después de la inhibición secuencial del complejo I con rotenona ( $0,1 \mu\text{M}$ ) y el complejo III con anticimicina A ( $2,5 \mu\text{M}$ ) (*Residual oxygen consumption*, ROX). Todos los inhibidores y el desacoplante pasan libremente a través de la membrana plasmática y no requieren por tanto permeabilización celular.

Para los cálculos se han corregido todos los flujos descontando la respiración no mitocondrial (ROX). Estos ensayos se llevaron a cabo al menos tres veces para cada condición experimental.

## 16.-Experimentos con animales.

En los experimentos de hipertiroidismo inducido se utilizaron ratones CD1 wt (N=12). El hipertiroidismo fue inducido en 6 ratones mediante la adición en el agua de la bebida de 95 y 25 ng/g de ratón de T3 y T4, respectivamente, y 0,01% de BSA. El agua de la bebida de los animales controles contenía el excipiente y 0.01% de BSA. Después de 14 días de tratamiento los ratones fueron sacrificados por decapitación cervical y las muestras de hígado y riñón fueron fijadas en formalina tamponada o congeladas en OCT. Para el análisis de los transcritos de *Dio1* se recogieron muestras de hígado que fueron guardadas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento. Estos experimentos se realizaron dos veces, en ratones de 2 y 6 meses de edad.

## 17.- Inmunohistoquímica.

Las muestras obtenidas de ratones se fijaron ON con 3,7% de formalina tamponada y se embebieron en parafina según un protocolo estándar o bien se congelaron rápidamente

(*flash freezing*) con N<sub>2</sub> líquido y fueron embebidas en OCT en moldes de inclusión (Tissue-Tek, Sakura). Para el análisis inmunohistoquímico de  $\gamma$ H2AFX empleamos secciones de 4  $\mu$ m de espesor de los bloques de parafina y para la tinción de 8-OH-dG usamos secciones de 10  $\mu$ m de muestras congeladas y fijadas 1 minuto en PFA al 1%. Las muestras fijadas en formalina fueron desparafinadas con Xilol (10 minutos/ dos veces) e hidratadas en gradientes decrecientes de etanol durante 2 minutos (100%, 75%, 50%, 25%) y H<sub>2</sub>O. El desenmascaramiento del antígeno fue llevado a cabo en un microondas de 700W de potencia en tampón citrato sódico (10 mM citrato sódico; 0,05% Tween-20, pH 6.0) en una olla de presión (*Microwave Tender Cooker, Nordic Ware*). Las muestras fueron sometidas a dos ciclos de 15 minutos cada uno empleando el 100% y el 50% de la potencia del microondas. A continuación la actividad peroxidasa endógena fue inhibida sumergiendo las muestras 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol durante 20 minutos. Las muestras fueron bloqueadas y permeabilizadas mediante la incubación con PBS/0,5% Tritón X-100 durante 30 minutos. La tinción con anticuerpos y el revelado fueron llevados a cabo empleando los *Vectastain® ABC Kits* de Vector Laboratories, empleando DAB (*DAB Substrate Kit*) como sustrato y siguiendo las instrucciones del proveedor, excepto para las muestras congeladas donde empleamos BSA 1% como agente bloqueante y diluyente del anticuerpo. Las incubaciones se llevaron a cabo ON a RT en una cámara de humedad para las muestras en bloques de parafina y 3 horas para las muestras congeladas, y usamos *Nuclear Fast Red* (Sigma, catálogo N3020) como agente de contraste. Los portaobjetos fueron montados con *DePex* (Serva, catálogo 18243) y cubreobjetos de distintos tamaños. Las fotografías se tomaron utilizando el microscopio *Nikon E90i* y el *software NES Elements* (Nikon). Para la cuantificación de focos se hicieron varias fotografías de diferentes campos al azar y se contabilizaron al menos 1.000 núcleos.

### 18.-Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos de los datos de este trabajo se realizaron utilizando el programa *Prism™ GraphPad (version 5.0)*. Con este programa se calculó la significación estadística ( $\alpha=0,05$ ), que se obtuvo utilizando análisis de varianza (*one-way ANOVA nonparametric*), seguido de un análisis post-test de Newman-Keuls, cuando había más de 2 grupos experimentales. Los *P values* obtenidos de estos análisis están indicados en la figuras. Otro test estadístico que se aplicó de forma específica cuando existían dos grupos experimentales fue el *two-tailed unpaired student's t-test*. Un asterisco (\*) indica  $P<0,05$ , el asterisco doble (\*\*),  $P<0,01$  y el asterisco triple (\*\*\*),  $P<0,001$ . Cuando se obtuvo un valor de  $P>0,05$  los datos fueron considerados no significativos (ns). Para el cálculo del valor medio, la desviación estándar (s.d.) y el error estándar de la media (SEM) se utilizó el *software Microsoft Excel*.

## Resultados



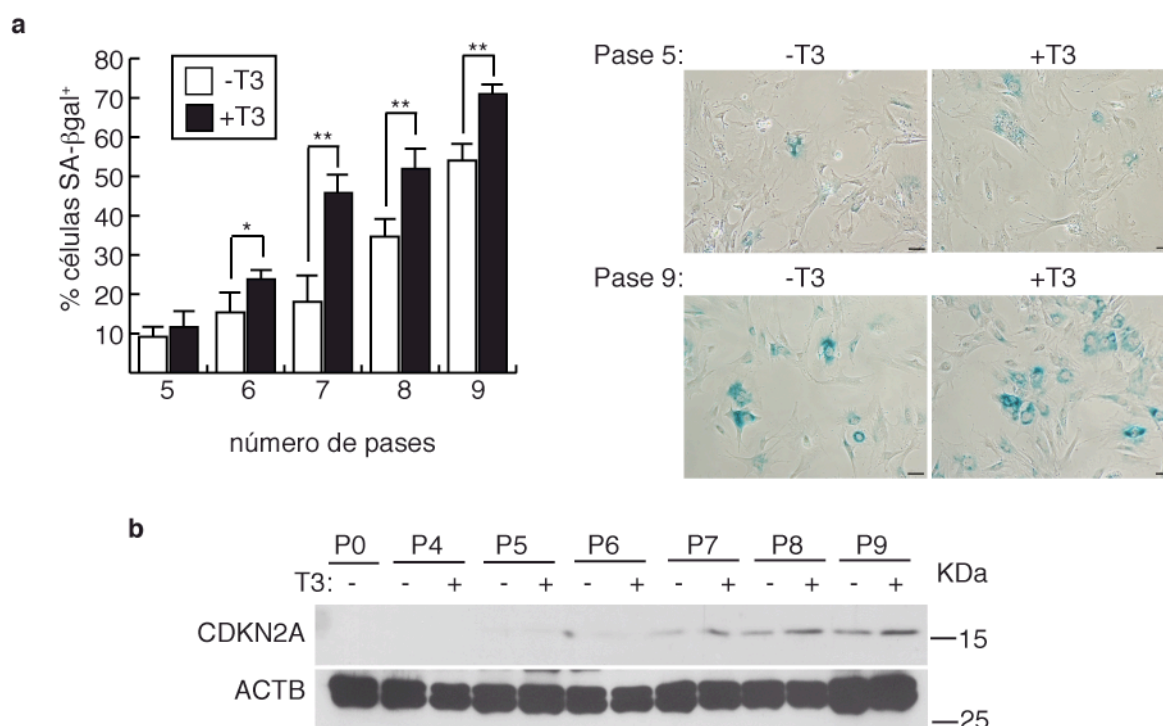
## 1. Influencia de la hormona T3 y de la expresión del receptor THRB en senescencia celular.

### 1.1. Efecto de la hormona T3 y del receptor THRB en la proliferación y senescencia de MEFs en cultivos primarios.

La hormona T3 produce la inhibición de la proliferación de varios tipos celulares, como las células de neuroblastoma de ratón N2a $\beta$  o fibroblastos que expresan THRB (218, 219, 228), y es capaz de revertir la progresión tumoral de nódulos preneoplásicos en hepatocarcinomas inducidos en ratas (149). Además, se ha puesto de manifiesto en nuestro laboratorio que la expresión de THR $\beta$ 1 (THRB) inhibe la transformación inducida por RAS oncogénico, bloqueando la inducción CCND1 (CICLINA D1) (88, 89). Otros resultados indican que THRB retrasa la formación de tumores e inhibe la formación de metástasis cuando se expresa constitutivamente en células tumorales humanas de hepatocarcinoma y carcinoma mamario (181, 182).

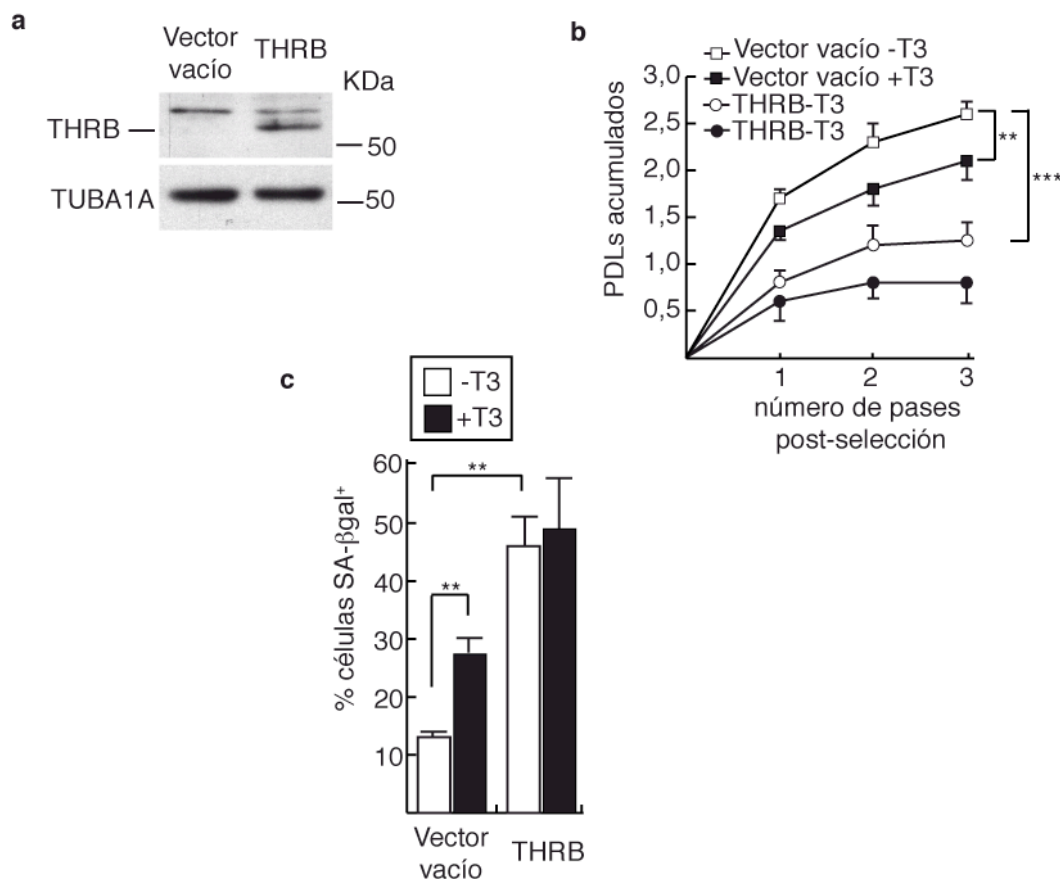
Ya que la senescencia celular es uno de los mecanismos más importantes para inhibir la transformación celular y la progresión tumoral, nos planteamos la hipótesis de que parte de la actividad antitumoral de la hormona T3 y del receptor THRB pudiera ser mediada por la inducción de senescencia celular. Con la finalidad de estudiar este fenómeno, empleamos fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). Los cultivos primarios de MEFs representan un modelo idóneo para este estudio, ya que entran en senescencia después de un número relativamente corto de pases en cultivo, tras acumular 15-20 PDLs (*population doubling levels*) (211). A partir de MEFs primarios obtenidos de ratones normales a 13,5 días post-coito, evaluamos la aparición de células senescentes entre los pases 5 y 9 en ausencia o presencia de la hormona T3 a una concentración cercana a la fisiológica (5 nM), siguiendo el protocolo de las células 3T3 establecido para MEFs (ver Mat&Met). Esta cantidad de hormona permite que la totalidad de los THRs presentes en la célula estén unidos a ligando. La exposición continua a hormona, dio lugar a un aumento en la expresión de marcadores de senescencia celular. Así, la expresión de la actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ gal) (66) en cada uno de los pases, fue mayor en las células tratadas con T3 (**Fig. 1a**), y también se encontraron mayores niveles de expresión de CDKN2A (4) en células tratadas con hormona (**Fig 1b**).





**Figura 1. Análisis de la expresión de la actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia celular (SA- $\beta$ gal) y de CDKN2A en MEFs primarios. a)** Actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ gal) en cada uno de los pases de los cultivos tratados o no con hormona T3 (panel izquierdo). La significación estadística ( $P < 0,0001$ ), obtenida en cada pase se muestra con asteriscos (\*= $P < 0,05$ , \*\*= $P < 0,01$ ). En el panel derecho se muestran micrografías representativas de los cultivos en pase 5 y 9. Magnificación de las micrografías 200X y escala de 10  $\mu$ m. **b)** Análisis de la expresión de CDKN2A en extractos celulares de cada uno de los pases celulares. Como control de carga se utilizó la proteína ACTB ( $\beta$ -ACTINA).

Ya que los MEFs no expresan altos niveles endógenos de THR. También analizamos la influencia de la expresión exógena de THRB en senescencia celular. Para ello, generamos mediante transducciones retrovirales cultivos de MEFs primarios que expresan constitutivamente y de forma estable este receptor. Después de la correspondiente selección, analizamos los niveles de expresión del receptor en los cultivos resistentes al agente de selección (Fig. 2a) y los sometimos al protocolo 3T3, durante tres pases consecutivos, para evaluar su capacidad proliferativa en presencia y ausencia de T3. La incubación con T3 inhibió la proliferación de los MEFs transducidos con el vector vacío, y la sobreexpresión de THRB dio lugar a una fuerte inhibición de la proliferación celular desde el primer pase tras la selección, que fue aún más acusada en presencia de T3 (Fig. 2b). La actividad SA- $\beta$ gal se evaluó tras el tercer pase consecutivo. Como se muestra en la Fig. 2c, la exposición de los cultivos a T3 durante 3 pases dio lugar a una acumulación significativa de células senescentes (alrededor del 30%). Adicionalmente, en cultivos que sobreexpresaban THRB, encontramos que aproximadamente el 50% de los MEFs ya eran senescentes. En este caso, la adición de T3 no aumentó significativamente los altos niveles alcanzados con la sola sobreexpresión de THRB.



**Figura 2. Efecto de la sobreexpresión de THR B en MEFs.** **a)** Niveles de expresión de THR B en los cultivos estables de MEFs primarios transducidos con un vector vacío o con THR B. Como control de carga utilizamos la proteína  $\alpha$ -TUBULINA (TUBA1A). **b)** Evaluación de la proliferación celular durante tres pases consecutivos de los cultivos, en ausencia o presencia de T3 (5 nM) ( $P < 0,0001$ ).  $PDLs = \log(N_t/N_0) \times 3,33$ ;  $N_t$  = número de células obtenidas al final del pase.  $N_0$  = número de células sembradas al inicio del pase. La significación estadística ( $P$ ), obtenida en el tercer pase se muestra con asteriscos (\*\*=  $P < 0,01$  y \*\*\*=  $P < 0,001$ ). **c)** Ensayo de la actividad SA- $\beta$ gal en células tras el tercer pase consecutivo ( $P = 0,0013$ ). Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales de dos experimentos distintos, la desviación estándar y la significación estadística (\*\*=  $P < 0,01$ ).

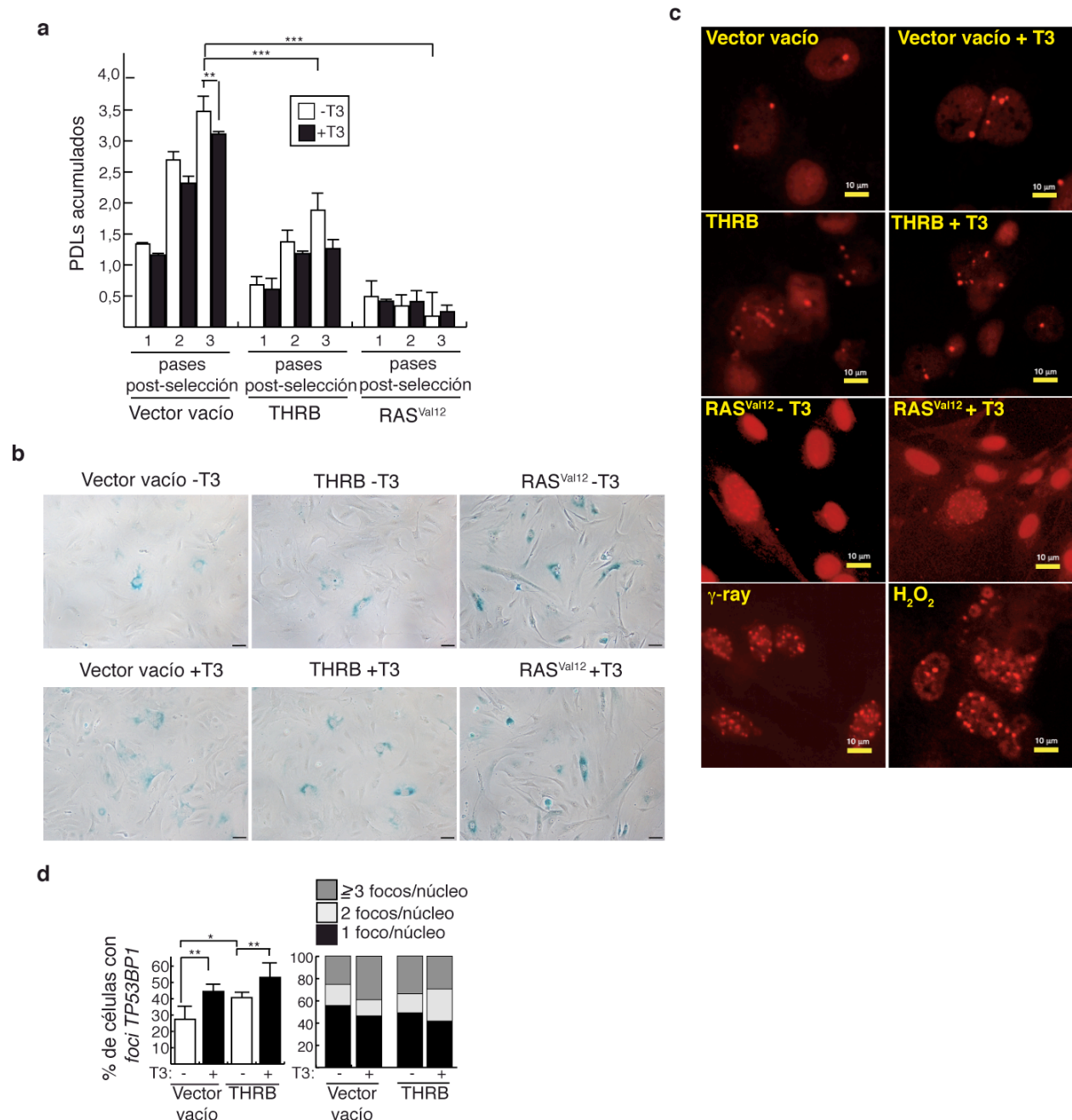
### 1.1.1. Comparación entre los efectos de THR B y RAS<sup>Val12</sup>. Análisis de la aparición de focos de daño al ADN.

En su conjunto, los resultados anteriores indicaban que la exposición continua de los MEFs normales a T3 era capaz de inducir senescencia celular y que este efecto era más acentuado tras la sobreexpresión de THR B. A continuación, comparamos los efectos de la T3 y del THR B, con el que se observa cuando sobreexpresamos la forma oncogénica de HRAS (RAS<sup>Val12</sup>). Se ha descrito que RAS<sup>Val12</sup> es un potente inductor de senescencia celular, la denominada senescencia inducida por oncogenes, OIS (*oncogene induced senescence*). La sobreexpresión de RAS<sup>Val12</sup> induce un daño replicativo masivo por el exceso en la señalización mitogénica, que conduce a un bloqueo proliferativo y a senescencia celular (17, 65, 180, 183, 260).

De acuerdo con estos antecedentes, la sobreexpresión de RAS<sup>Val12</sup> dio lugar a un bloqueo completo de la proliferación desde el primer pase post-selección (**Fig. 3a**). Aun cuando la sobreexpresión de THRB induce una fuerte inhibición de la proliferación celular, ésta tiene unos efectos más moderados que los producidos por RAS<sup>Val12</sup>. En consonancia con estos resultados, encontramos que el oncogén indujo la senescencia de prácticamente toda la población de MEFs (más del 70%), mientras que el receptor indujo la senescencia de aproximadamente la mitad de la población (**Fig. 3b**).

Las células senescentes suelen presentar un daño genómico significativo y una activación persistente de la señalización del daño y reparación del ADN (242). Después de tres pases consecutivos en presencia y ausencia de T3, evaluamos la presencia de los denominados focos asociados a daño genómico. Estos focos están constituidos por proteínas implicadas en la señalización del daño y también por proteínas que tienen funciones en su reparación. Una de estas proteínas es TP53 *binding protein* 1 (TP53BP1), también denominada 53BP1, que denota la rotura del ADN en sus dos cadenas (*double-strand breaks*, DSBs). El tratamiento con T3, al igual que la sobreexpresión de THRB, dio lugar a un incremento significativo del número de focos que contenían TP53BP1 (**Fig. 3c**). El patrón de expresión de TP53BP1 observado en estas dos condiciones fue cuantitativa y cualitativamente distinto al obtenido tras la sobreexpresión de RAS<sup>Val12</sup>. La mayoría de las células que sobreexpresaban RAS<sup>Val12</sup>, tanto en ausencia como en presencia de T3, presentaban una expresión de TP53BP1 muy elevada y una distribución homogénea por todo el núcleo (*pan-nuclear*), consistente con un daño replicativo masivo, aunque también observamos células que presentaban numerosos focos de daño, que abarcaban todo el núcleo (**Fig. 3c**). En el caso de la sobreexpresión de THRB o el tratamiento con T3, los focos de daño al ADN que se aprecian son discretos y de un tamaño que permitió su cuantificación. El tratamiento con hormona dio lugar a un incremento en el porcentaje de células que presentaban focos, aunque los mayores niveles los encontramos en los cultivos de células que sobreexpresaban THRB y que fueron tratadas con T3. De la misma forma, las células tratadas con T3 o que sobreexpresaban THRB presentaban un mayor número de focos por núcleo que las células control sin tratar (**Fig. 3d**).

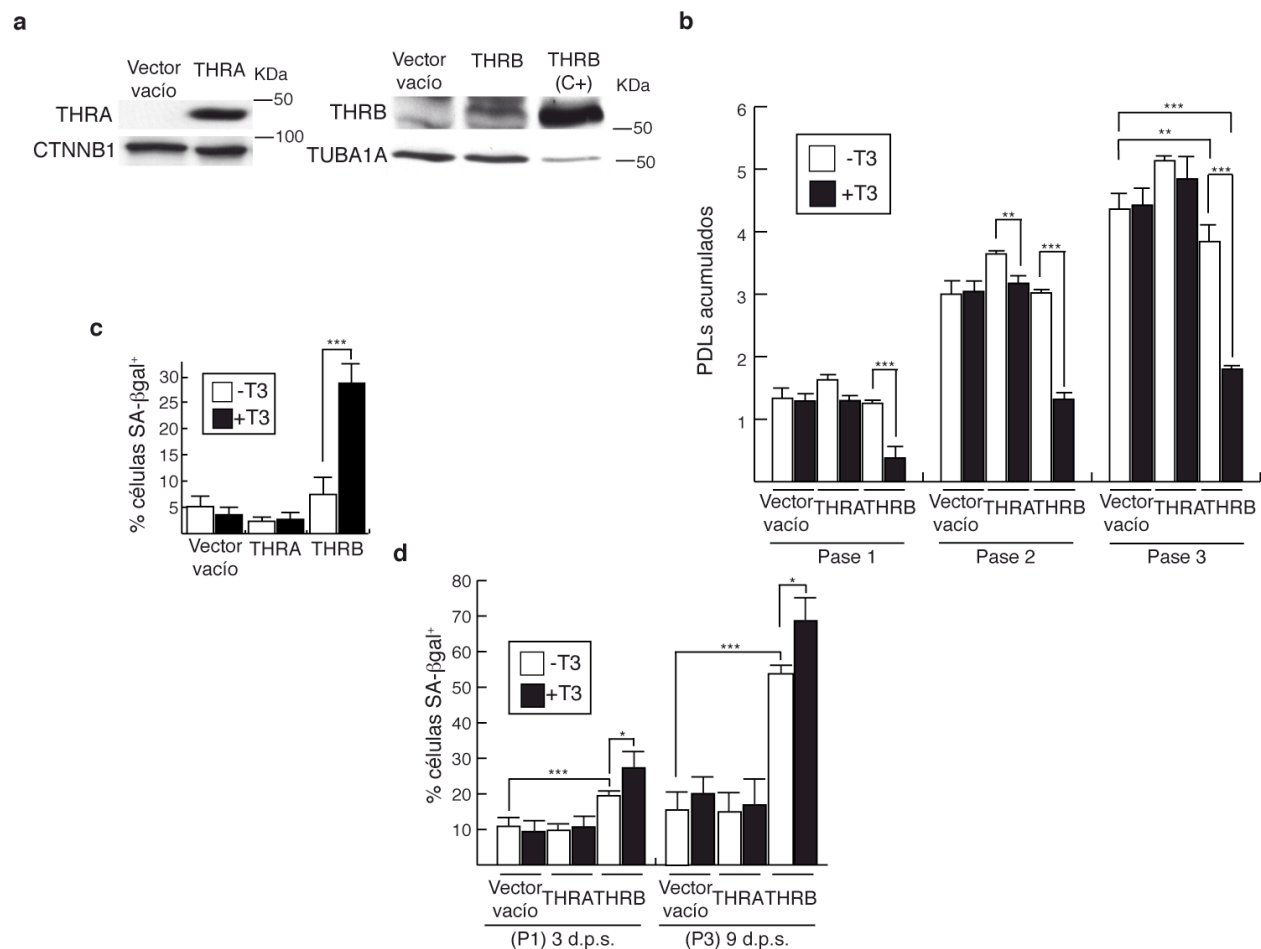
La formación de focos de daño al ADN inducida por la T3 y el THRB también se comparó con la que se obtiene cuando las células fueron sometidos a otros estímulos que causan daño al ADN y senescencia, como la irradiación con rayos gamma o un *shock* oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En general, la morfología y distribución de los focos observados tras la incubación con la hormona o la sobreexpresión de THRB no diferían sustancialmente de los que observaron con dichos tratamientos, aunque el número de focos formado fue menor (**Fig. 3c**). En estas condiciones, la incubación con T3 no dio lugar a un mayor aumento en la aparición de focos, debido probablemente a la potencia de estos inductores de senescencia celular.



**Figura 3. Comparación del efecto de THRΒ y RAS<sup>Val12</sup> en la proliferación celular de MEFs y análisis de focos de daño al ADN.** **a)** Evaluación de la proliferación celular durante tres pases consecutivos de cultivos estables de MEFs que sobreexpresan THRΒ o RAS<sup>Val12</sup>, en presencia o ausencia de T3 (5 nM) ( $P < 0,0001$ ).  $PDLs = \log(N_t/N_0) \times 3,33$ ;  $N_t$  = número de células obtenidas al final del pase.  $N_0$  = número de células sembradas al inicio del pase. **b)** Micrografías representativas de ensayos de SA-βgal en MEFs que expresan THRΒ o RAS<sup>Val12</sup> en el tercer pase-post-selección. Magnificación de las micrografías 200X y escala de 10 μM. **c)** Evaluación por inmunofluorescencia (IF) de la presencia de focos que contienen TP53 binding protein 1 (TP53BP1) en diferentes condiciones experimentales, i) después del tercer pase consecutivo de células control (vector vacío) o que sobreexpresan THRΒ o RAS<sup>Val12</sup>, tratadas o no con T3, ii) MEFs sometidos a 1 Gy de radiación gamma (γ-ray) (las células fueron procesadas para IF 60 min post-radiación) y iii) después del tercer pase consecutivo de MEFs sometidos a un shock de 2 horas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (600 μM). Magnificación de las micrografías 400X. **d)** Cuantificación de los focos de daño al ADN que contienen TP53BP1 en los cultivos estables de células control (vector vacío) o que sobreexpresan THRΒ, después del tercer pase consecutivo en presencia o ausencia de T3 (5 nM) ( $P = 0,018$ ). Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales, la desviación estándar y la significación estadística ( $P$ ) (\*= $P < 0,05$ , \*\*= $P < 0,01$ ).

### 1.2. Efecto de la hormona T3 y del receptor THRB en la proliferación y senescencia celular de MEFs $\text{THR}^{\text{A}(-/-)\text{B}(-/-)}$ inmortalizados. Influencia de las principales isoformas del THR.

Con el objetivo de evaluar la contribución de las principales isoformas de los THRs en senescencia celular empleamos MEFs que no expresan ninguno de los dos genes de los THRs ( $\text{THR}^{\text{A}(-/-)\text{B}(-/-)}$ , en adelante  $\text{THRABKO}$ ). Estos MEFs se inmortalizaron espontáneamente en cultivo y no expresan TP53 (datos no mostrados). En este contexto, generamos cultivos que expresaban constitutivamente de forma estable las dos principales isoformas del THR, THRA y THRB. Después de la correspondiente selección, confirmamos la expresión de THRA y THRB en extractos celulares (**Fig. 4a**) y evaluamos la capacidad proliferativa durante tres pases consecutivos en presencia o ausencia de hormona. Como se espera de células que no expresan el THR endógenamente, la exposición a T3 no dio lugar a la inhibición de la proliferación celular del control (vector vacío) (**Fig. 4b**). Adicionalmente, sólo la expresión de THRB, pero no de THRA, inhibió la proliferación drásticamente en presencia de ligando. Después del tercer pase consecutivo evaluamos la expresión de la SA- $\beta$ gal, encontrando de la misma forma que sólo la expresión de THRB en presencia de ligando indujo una acumulación significativa (más del 25%), de células senescentes en los cultivos (**Fig. 4c**). Estos cultivos se sometieron también a un *shock* de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con el objeto de evaluar la influencia de la expresión de THRs en la senescencia inducida o prematura producida por este agente altamente oxidante. Después de 1 pase (3 días) o de 3 pases post-shock (9 días) evaluamos la aparición de células senescentes mediante la expresión de la SA- $\beta$ gal. Como se observa en la **Fig. 4d**, el tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  solamente fue capaz de inducir senescencia celular después de 3 pases en aproximadamente el 10-20% de células control (vector vacío) o que sobreexpresaban THRA. Sin embargo, la expresión de THRB aumentó significativamente los niveles de senescencia ya en el primer pase hasta el 20%, llegando casi al 30% en presencia de hormona. Después del tercer pase, los niveles más altos se encontraron en células que sobreexpresaban THRB y en presencia de ligando, llegándose a acumular casi un 70% de células senescentes, un hecho muy significativo teniendo en cuenta que estas células son inmortales (**Fig. 4d**). En su conjunto, los resultados obtenidos con este tipo de MEFs, nos indicaban que la isoforma del THR que induce senescencia celular es THRB y que es capaz de hacerlo en un contexto celular inmortalizado, TP53 negativo y resistente a senescencia celular replicativa. De la misma forma, el THRB es capaz de aumentar la senescencia celular prematura inducida mediante un *shock* oxidativo.



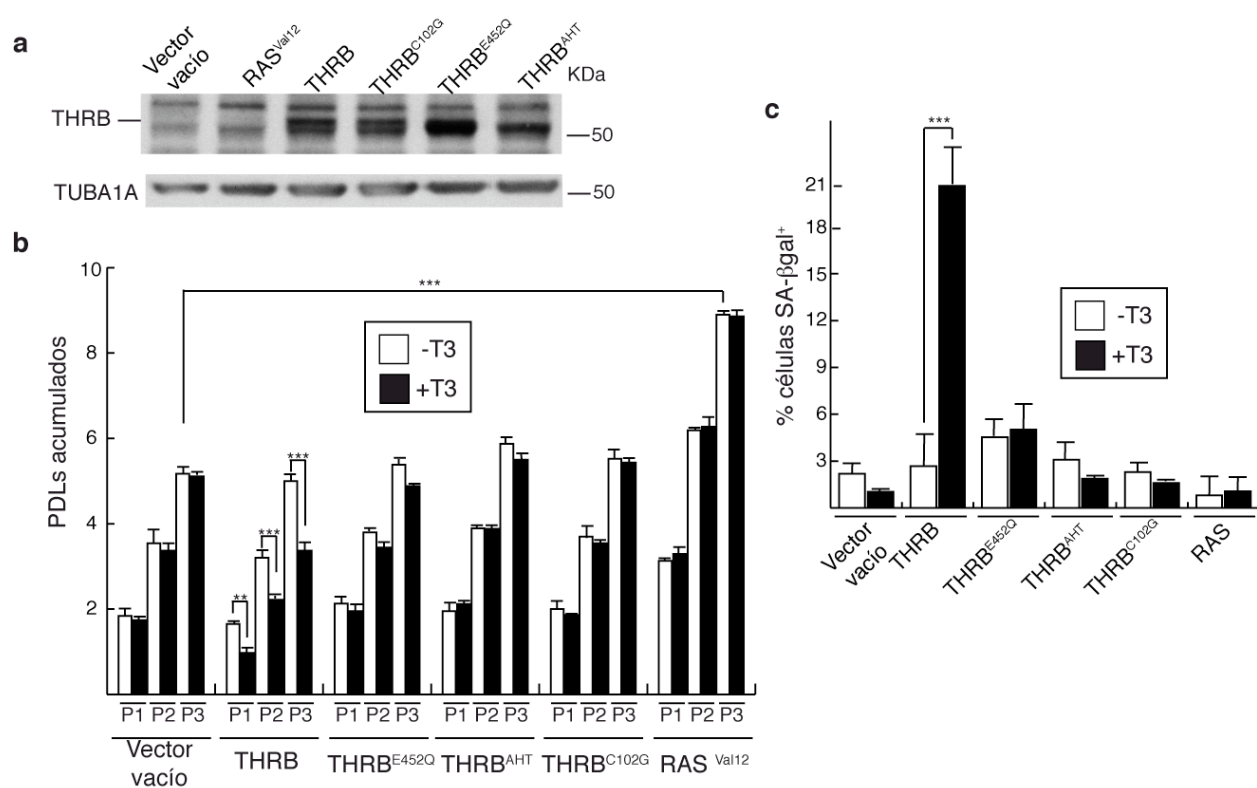
**Figura 4. Análisis de la influencia de las principales isoformas de los THR en senescencia celular de MEFs inmortalizados THRABKO.** **a)** Evaluación de la expresión de THRA y THR por *western-blotting* en los cultivos estables generados. Como control de carga utilizamos CTNNB1 ( $\beta$ -CATENINA) y TUBA1A. Como control positivo (C+), utilizamos extractos de fibroblastos IMR90 transfectados establemente con THR. **b)** Evaluación de la proliferación celular durante tres pases consecutivos tras la selección en ausencia y presencia de ligando (T3 5 nM) ( $P < 0,0001$ ).  $PDLs = \log(N_t/N_0) \times 3,33$ ;  $N_t$  = número de células obtenidas al final del pase.  $N_0$  = número de células sembradas al inicio del pase. **c)** Análisis de la actividad SA- $\beta$ gal después del tercer pase consecutivo ( $P < 0,0001$ ). **d)** Evaluación de la SA- $\beta$ gal en los cultivos sometidos a un *shock* de 2 horas con  $H_2O_2$  (600  $\mu$ M), y tratados posteriormente en ausencia y presencia de hormona durante el primer pase (3 días post-shock) o durante 3 pases (9 días post-shock) ( $P < 0,0001$ ). Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales, la desviación estándar y la significación estadística ( $P$ ) (\*= $P < 0,05$ , \*\*= $P < 0,01$  y \*\*\*= $P < 0,001$ ).

### 1.3. Efecto de diferentes mutantes del receptor THR en la proliferación y senescencia de MEFs $THR^{A(-/-)B(-/-)}$ .

A continuación, nos planteamos evaluar el papel de los diferentes dominios funcionales del receptor en la inducción de senescencia celular. Para ello, en MEFs THRABKO se transdujeron establemente diferentes mutantes del THR; E452Q que no une coactivadores, AHT que no recluta correpressores y C102G que no se une al ADN. Cuando se analizó la expresión del THR en extractos celulares se pudo observar que los diferentes mutantes se expresaron a niveles similares al receptor nativo (Fig. 5a). Como en los apartados anteriores,



se evaluó la capacidad proliferativa de estas células en 3 pases consecutivos en ausencia y presencia de T3 (**Fig. 5b**), y después del tercer pase también se evaluó la expresión de SA- $\beta$ Gal (**Fig. 5c**). De esta forma, se comprobó que tanto la inhibición de la proliferación como la inducción de senescencia requieren de la expresión de THR $\beta$  transcripcionalmente funcional, ya que que, a diferencia del receptor nativo, ninguno de los mutantes utilizados fue capaz de inducir ninguno de los dos procesos. En este contexto, también se expresó de forma estable la variante oncogénica de RAS (RAS<sup>Val12</sup>), y a diferencia de los resultados obtenidos en MEFs normales en los que es un fuerte inductor de senescencia, en fibroblastos inmortalizados tiene un papel mitogénico promoviendo la proliferación celular (**Fig. 5b**) y no aumenta los niveles de expresión del marcador de senescencia SA- $\beta$ Gal (**Fig. 5c**).



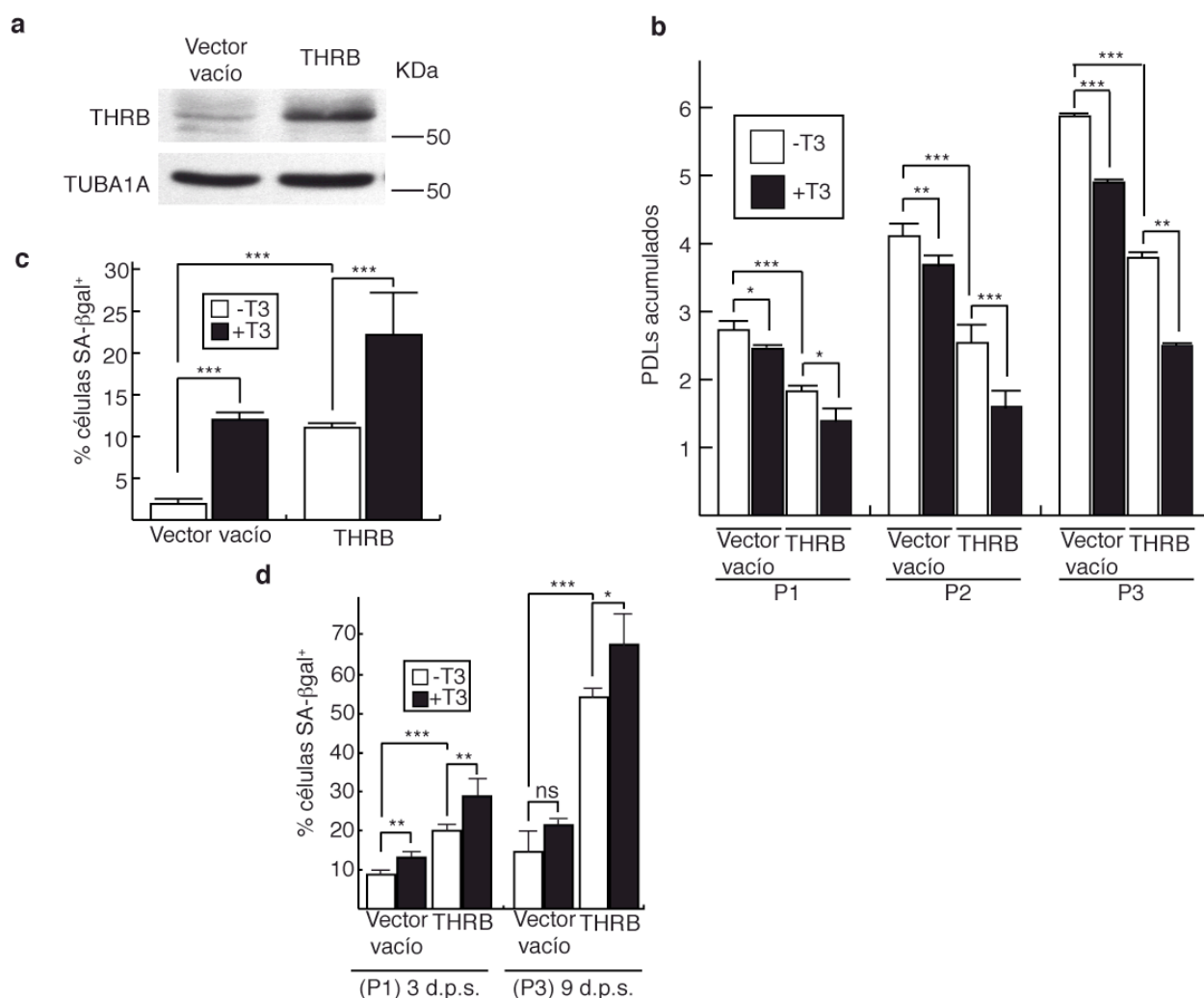
**Figura 5. Análisis de la influencia de diferentes mutantes de THR $\beta$  en senescencia celular de MEFs inmortalizados THRABKO.** **a)** Evaluación de la expresión de THR $\beta$  por *western-blotting* en los cultivos estables generados. Como control de carga utilizamos TUBA1A. **b)** Evaluación de la proliferación celular durante tres pases consecutivos tras la selección en ausencia y presencia de ligando (T3 5 nM) ( $P < 0,0001$ ).  $PDLs = \log(N_f/N_0) \times 3,33$ ;  $N_f$  = número de células obtenidas al final del pase.  $N_0$  = número de células sembradas al inicio del pase. **c)** Análisis de la actividad SA- $\beta$ gal después del tercer pase consecutivo ( $P < 0,0001$ ). Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales, la desviación estándar y la significación estadística ( $P$ ) (\*\*=  $P < 0,01$  y \*\*\*=  $P < 0,001$ ).

#### 1.4. Efecto de la hormona T3 y del receptor THRB en la proliferación y senescencia celular de MEFs *Tp53*<sup>(-/-)</sup>.

En función de los resultados presentados en el apartado anterior, generamos cultivos estables en MEFs obtenidos de ratones *Tp53*<sup>(-/-)</sup> (TP53KO, en adelante), para estudiar las bases moleculares de la inducción de senescencia celular por el THRB. Estos MEFs, al igual que los MEFs normales, expresan THRs endógenamente, lo que nos permite evaluar el efecto de la T3 aún sin sobreexpresar el receptor. Por otra parte, son inmortalizados y resistentes a senescencia replicativa, como los MEFs THRABKO y la mayoría de líneas celulares, y la disponibilidad celular, por tanto, no es tan limitante como en el caso de los MEFs obtenidos de ratones normales.

Al igual que en los casos anteriores analizamos la expresión de THRB en los cultivos generados (Fig.6a) y su capacidad proliferativa. La exposición continua a hormona dio lugar a la inhibición de la proliferación (Fig.6b) y confirmamos nuevamente que la sobreexpresión de THRB es un potente inhibidor de la proliferación sobre todo en presencia de ligando. De la misma forma, THRB fue capaz de inducir la acumulación de células senescentes después del tercer pase, hasta un 20-25%, en un contexto TP53 negativo (Fig.6c). Los cultivos que sobreexpresaban THRB fueron también los más sensibles a un *shock* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de forma que THRB actuó cooperativamente con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducir senescencia prematura (Fig.6d).





**Figura 6. Efecto de la hormona T3 y de la expresión de THR en senescencia celular de MEFs TP53KO.** **a)** Niveles de la expresión del THR en células transfectadas establemente con el vector vacío y THR. Se utilizó la proteína TUBA1A ( $\alpha$  tubulina) como control de carga. **b)** Evaluación de la proliferación celular de los cultivos generados, en ausencia y presencia de T3 (5nM) durante tres pases consecutivos ( $P < 0,0001$ ).  $PDLs = \log(N_t/N_0) \times 3,33$ ;  $N_t$  = número de células obtenidas al final del pase.  $N_0$  = número de células sembradas al inicio del pase. **c)** Análisis de la SA- $\beta$ gal después del tercer pase en presencia y ausencia de T3 ( $P < 0,0001$ ). **d)** Análisis de la SA- $\beta$ gal de los mismos cultivos sometidos a un *shock* de 2 horas con  $H_2O_2$  (600  $\mu$ M), después del primer pase (3 días *post-shock*) o del tercero (9 días *post-shock*) ( $P < 0,0001$ ). Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales, la desviación estándar y la significación estadística ( $P$ ) (\*= $P < 0,05$ , \*\*= $P < 0,01$  y \*\*\*= $P < 0,001$ ).

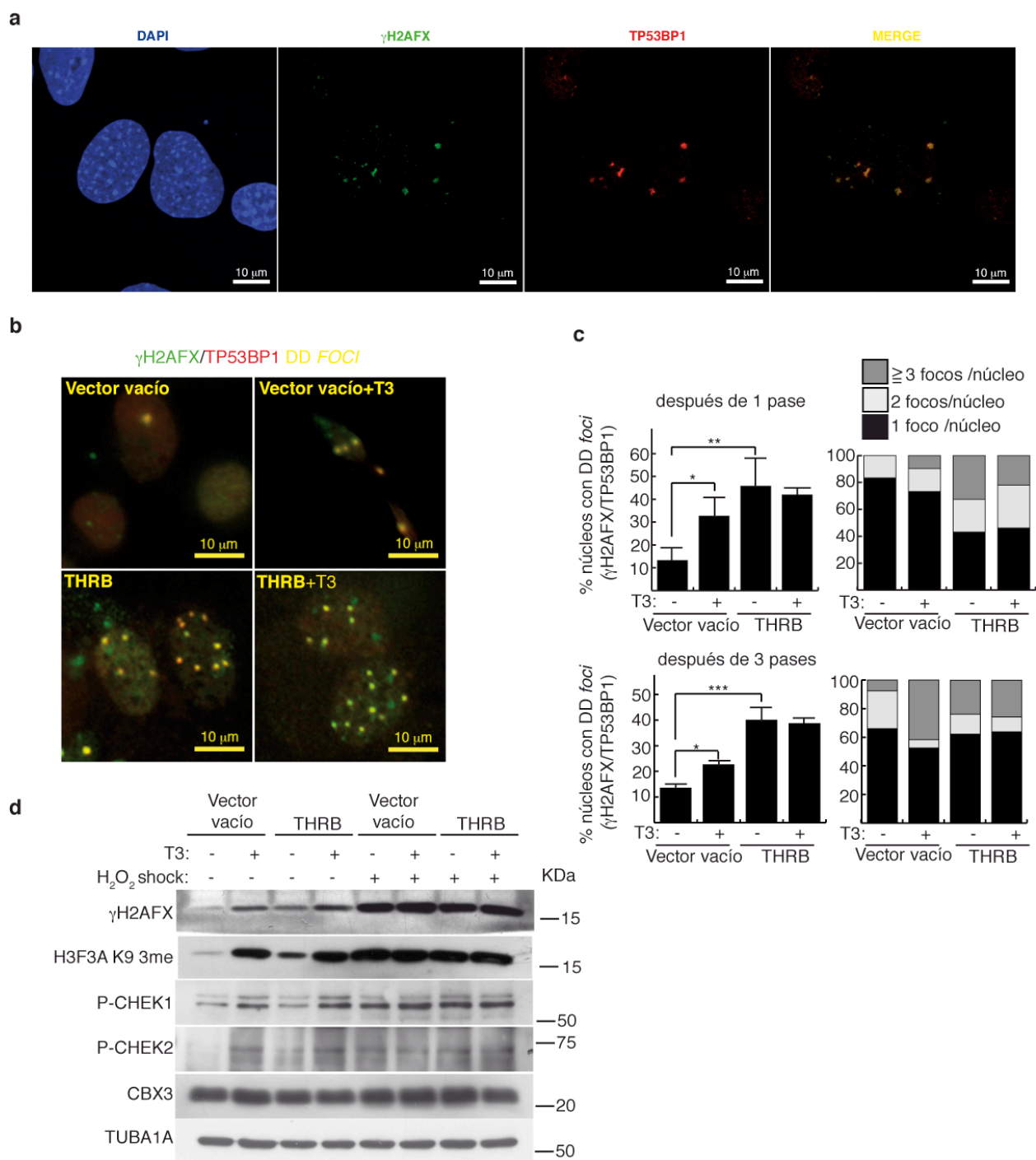
## 2. Influencia de la hormona T3 y de la expresión del receptor THRB en daño genómico.

### 2.1. El tratamiento con hormona T3 y la sobreexpresión del receptor THRB inducen la aparición de focos de daño al ADN.

Los resultados iniciales obtenidos con MEFs normales (apartado 1.1.1), indicaban que tanto la hormona T3 como la expresión de THRB eran capaces de inducir la presencia de focos de daño al ADN que contenían TP53BP1, un marcador de DSBs. De la misma forma, aunque con mayor magnitud, observamos lo mismo cuando empleamos otros inductores como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la radiación gamma o la sobreexpresión de RAS<sup>Val12</sup>. Con el objetivo de estudiar la presencia de daño genómico, su naturaleza y origen, y la capacidad reparadora de las células, empleamos MEFs TP53KO y MEFs normales.

La presencia de DSBs se confirmó mediante el doble marcaje con  $\gamma$ H2AFX y TP53BP1. Cuando se producen DSBs ambas proteínas colocalizan en puntos discretos fácilmente identificables mediante inmunofluorescencia indirecta. El análisis de microscopía confocal indicó que existía una cofocalización cercana al 100% de estos dos marcadores en MEFs TP53KO (**Fig. 7a**). En estos cultivos observamos que el tratamiento con T3 aumentó la aparición de este tipo de foco después de tres pases consecutivos. De la misma forma que en ensayos anteriores, la expresión constitutiva de THRB conduce también a un incremento drástico en la formación de estos focos, tanto en el porcentaje de células que contenían focos como en aquéllas que expresaban un mayor número de estos focos por núcleo (**Fig. 7b**). La presencia de estos focos fue ya patente tras el primer pase (**Fig.7c**), donde observamos no solamente un incremento significativo del porcentaje de células dañadas, sino también un aumento en el número de focos por núcleo, sobre todo en el caso de células tratadas con T3.

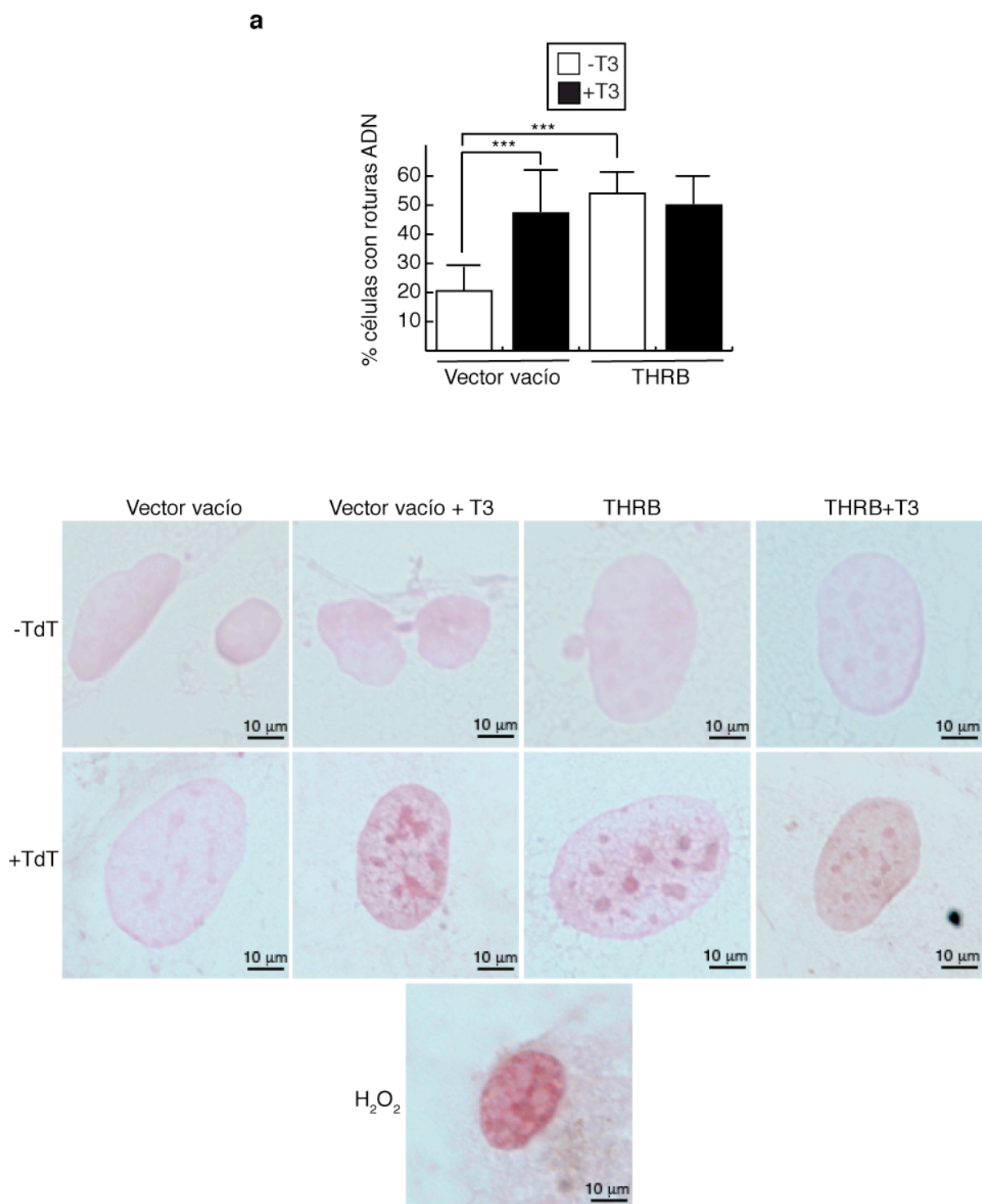
El tratamiento con T3 y la expresión de THRB conduce a la expresión o activación de varios marcadores de daño genómico como la fosforilación de H2AFX, CHEK1 y CHEK2 (**Fig. 6d**). Asimismo, la trimetilación de la histona H3 en la lisina 9 (H3F3A K9 3me), que como se ha mencionado se asocia a la heterocromatinización característica de las células senescentes, aumentó de forma significativa en estas condiciones. De la misma forma, los niveles de todos estos marcadores también se elevaron en células sometidas a un shock de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aunque en este caso no pudimos observar efectos cooperativos con la hormona T3 ni con el THRB, debido probablemente a la potencia del agente inductor.



**Figura 7. Análisis de la presencia de focos de daño al ADN que contienen  $\gamma$ H2AX y TP53BP1 en MEFs TP53KO.** **a)** Análisis por microscopía confocal de los focos de daño observados en MEFs TP53KO que sobreexpresan THRB. Magnificación de las micrografías 600X y escala de 10  $\mu$ m. **b)** Presencia de focos de daño al ADN que contienen  $\gamma$ H2AX y TP53BP1 después del tercer pase consecutivo de MEFs TP53BP1 que sobreexpresan o no THRB, en presencia o ausencia de T3. Magnificación de las micrografías 400Xy escala de 10 mm. **c)** Cuantificación de los focos de daño, después de 1 pase ( $P=0,0061$ ) y de 3 pases ( $P=0,0004$ ), en las diferentes condiciones experimentales. Se muestra el porcentaje de células que contienen focos así como el número de focos por núcleo (porcentaje de células con 1, 2 o más de 3 focos). Se analizaron más de 200 células en cada una de las condiciones. Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales, la desviación estándar y la significación estadística ( $P$ ) (\*= $P<0,05$ , \*\*= $P<0,01$  y \*\*\*= $P<0,001$ ). **d)** Análisis de la expresión de varios marcadores de daño en el ADN o de las rutas de señalización del mismo en las diferentes condiciones experimentales tras el tercer pase consecutivo o sometidas inicialmente a un shock de dos horas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (600  $\mu$ M).  $\gamma$ H2AX y las proteínas CHEK son mediadores de la señalización del daño y reparación del ADN. H3F3A K9 3me es un marcador de heterocromatinización. CBX3 (proteína de unión a heterocromatina 1 $\gamma$ , HP1 $\gamma$ ); TUBA1A se utilizó como control de carga.

## 2.2. El tratamiento con hormona T3 y la sobreexpresión del receptor THRB inducen roturas físicas en el ADN.

Como hemos comentado en el apartado anterior, tanto el tratamiento con T3 como la sobreexpresión de THRB inducían la aparición de focos de daño al ADN de doble cadena. Por lo que nos planteamos analizar la presencia de roturas en el ADN después de tres pases consecutivos en ausencia y presencia de ligando en MEFs TP53KO. Para ello empleamos la enzima la TdT (deoxiribonucleótido transferasa terminal) que incorpora nucleótidos (dUTP-11-biotina) en los extremos 3' sin necesidad de usar molde para la síntesis. Este nucleótido marcado nos permitió detectar los sitios donde se habían producidos roturas en el ADN, que se corresponden con los lugares en los que se había introducido el nucleótido. El porcentaje de células con rotura en el ADN en condiciones basales es del 20% y dicho porcentaje aumenta a valores próximos al 50% cuando los MEFs se cultivan en presencia de T3 y/o sobreexpresan el receptor THRB (**Fig. 8**).



**Figura 8. Análisis de la presencia de roturas físicas en el ADN en MEFs TP53KO.** **a)** Cuantificación del porcentaje de células que presentan roturas en el ADN después de 3 pases consecutivos (9 días) de MEFs TP53KO que sobreexpresan o no THRB, en presencia o ausencia de T3 (5nM) ( $P < 0,0001$ ). Como control positivo se trató con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (600 μM) durante 2 horas. Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales, la desviación estándar y la significación estadística ( $P$ ) (\*\*\*) ( $P < 0,001$ ). **b)** Micrografías representativas de MEFs en las condiciones anteriores que presentan roturas en el ADN. Magnificación de las micrografías 600X y escala de 10 μm.

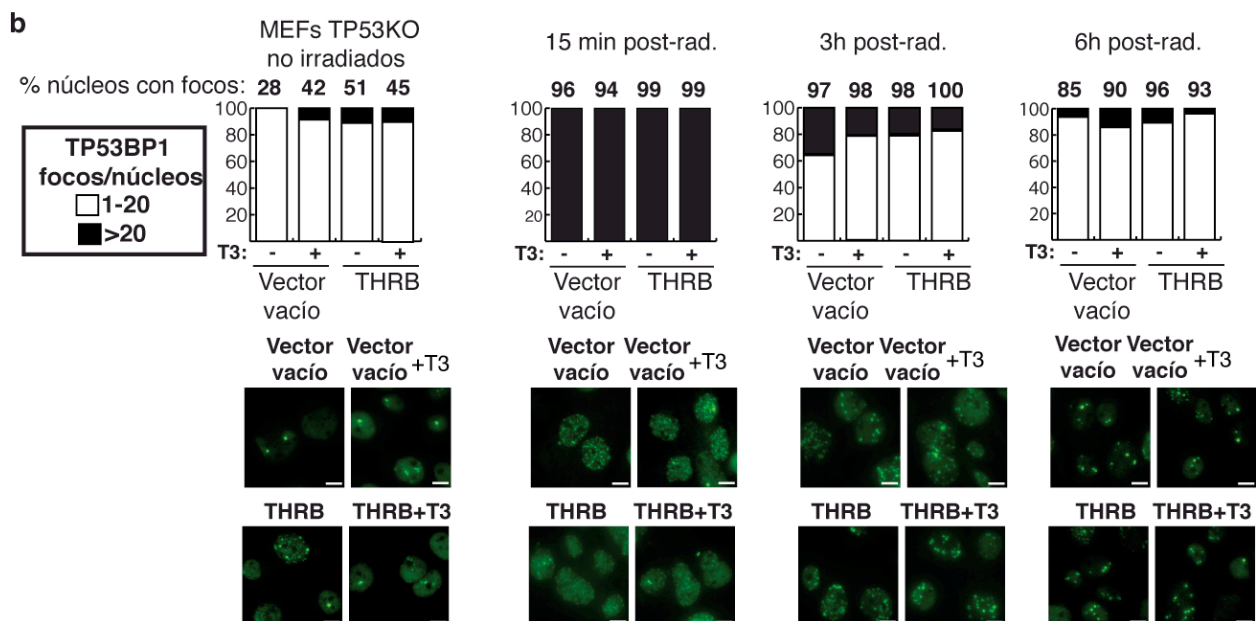
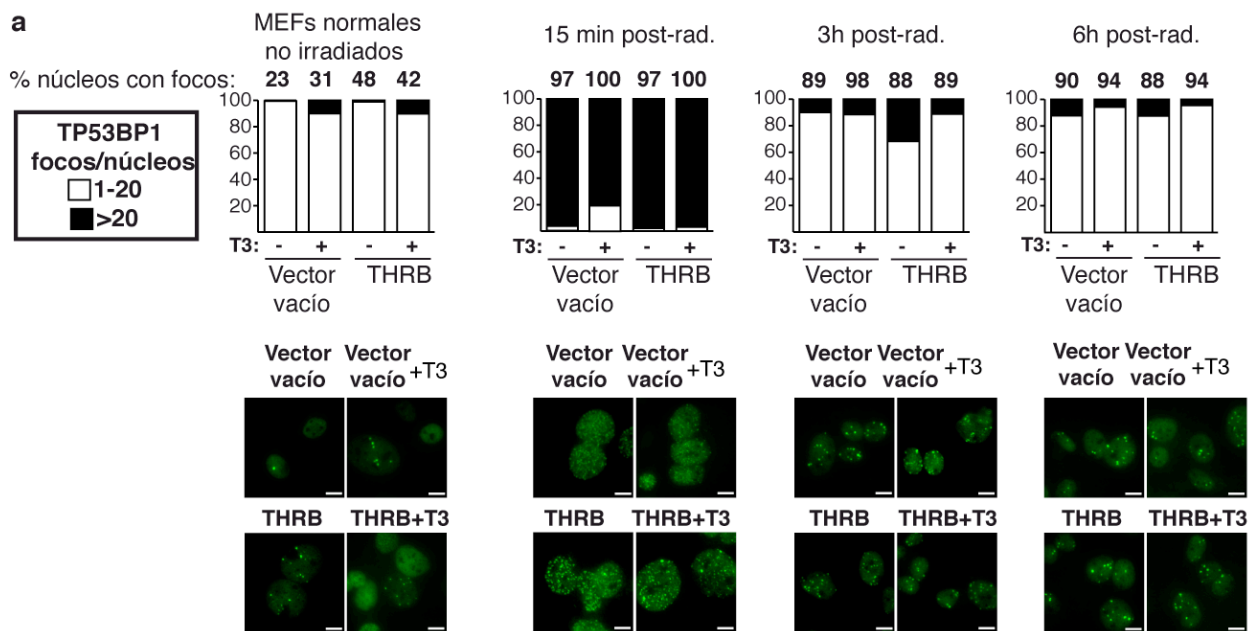
### 2.3. Influencia de la expresión de THRB y del tratamiento con T3 en la capacidad reparadora celular del daño genómico.

De forma simplificada, podemos dividir el daño genómico en intrínseco cuando ocurre por la propia actividad metabólica normal de la célula o extrínseco cuando el daño está causado por agentes genotóxicos externos o por factores ambientales como la luz UV, la radiación, etc. El resultado es que, según estimaciones, una célula está sometida a 1 millón de lesiones por día (164). Para mantener la viabilidad celular, por tanto, se requiere una eficiente maquinaria de reparación.

En función de los resultados anteriores, nos planteamos analizar si el daño genómico observado tras el tratamiento hormonal y la sobreexpresión de THRB pudiera ser debido a que en estas condiciones los mecanismos de reparación estuviesen deteriorados. Por ello, analizamos la capacidad reparadora de la célula en nuestras condiciones experimentales después de someter a las células a radiación gamma. Para ello, empleamos MEFs normales y TP53KO que expresan o no THRB y que fueron tratados durante 24 horas con la hormona y entonces sometidos a 3 Gy de radiación, una dosis que inflige un daño masivo en el ADN. Posteriormente, monitorizamos por inmunofluorescencia indirecta la expresión de focos de daño al ADN a lo largo del tiempo y además, las células irradiadas fueron mantenidas durante tres pases consecutivos para conocer el efecto de la T3 y la expresión de THRB sobre la viabilidad celular post-radiación.

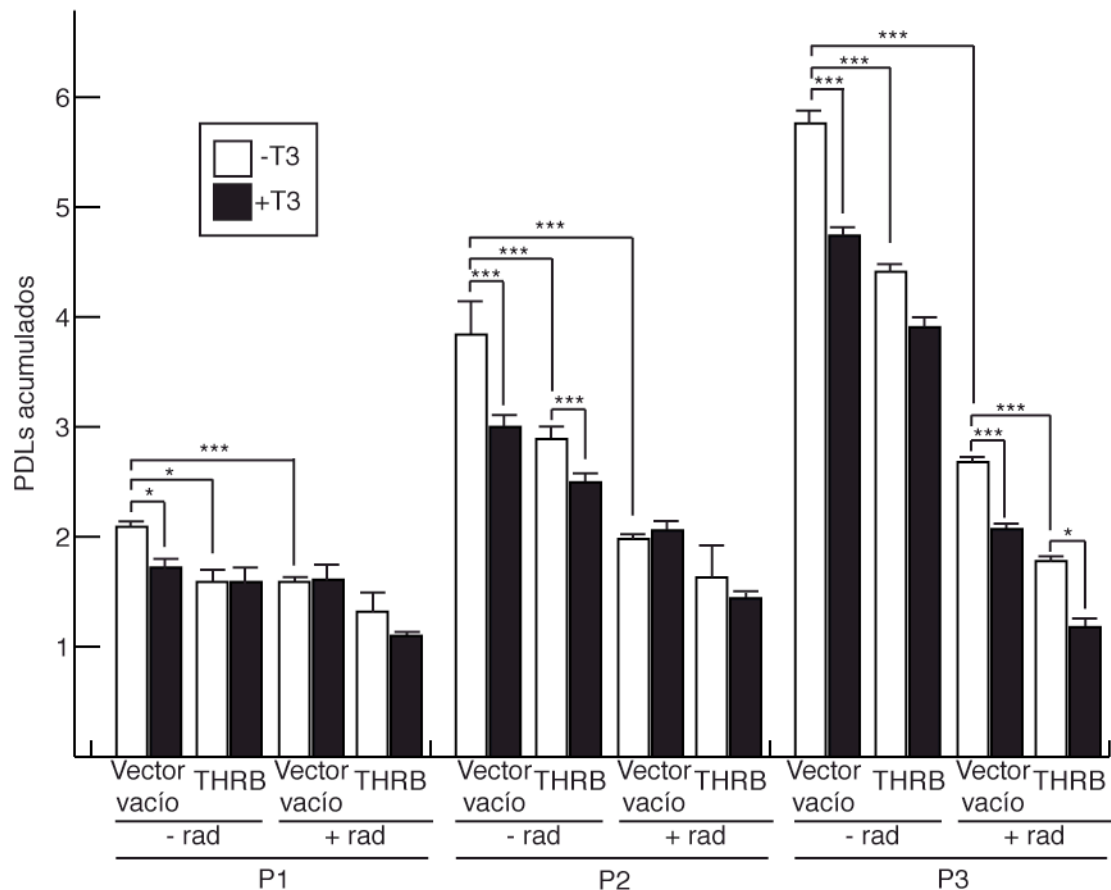
Como se muestra en la **Fig 9**, observamos que en las células antes de la irradiación tanto la T3 como la expresión de THRB indujeron un aumento del porcentaje de células con focos de daño al ADN y del número de focos/núcleo, demostrando de nuevo que el daño genómico inducido por la hormona es un evento temprano ya que es detectable a las 24 horas.

Esto se observó en los dos sistemas celulares empleados (MEFs normales y TP53KO). Después de tan sólo 15 min post-radiación se observa en todas las condiciones experimentales una formación masiva de focos que abarca todo el núcleo y todas las células. A partir de las 3 horas, y sobre todo a las 6 horas post-radiación, la mayoría de las células contienen todavía focos pero se observa que se han reducido drásticamente el número de células altamente dañadas (>20 focos; incontables). Del análisis de estos focos de daño podemos concluir que no existen diferencias significativas en la capacidad reparadora post-radiación entre las distintas condiciones experimentales de los dos sistemas de células empleados, que pudieran explicar el aumento de daño al ADN observado en presencia de T3 o THRB. Cuando determinamos la capacidad proliferativa *post-shock* durante tres pases consecutivos, observamos que tanto la exposición continua a T3 como la sobreexpresión de THRB tienen efectos deletéreos sobre la viabilidad celular, actuando de forma cooperativa con la radiación gamma en el bloqueo de la proliferación.





c



**Figura 9. Análisis de la capacidad reparadora celular post-radiación.** Inmunofluorescencia indirecta de TP53BP1 en MEFs normales (a) y TP53KO (b) que sobreexpresaban THR B o no (vector vacío) sometidos a 3 Gy de radiación gamma. Las células fueron tratadas 24 horas con T3 (5 nM) antes de la irradiación. Se muestra el porcentaje de células que contienen focos de daño al ADN y el número de focos/núcleo observados antes de la irradiación y a distintos tiempos post radiación (15 min, 3 y 6 horas). Las micrografías son representativas de cada una de las condiciones experimentales (magnificación 400X y escala de 10  $\mu$ m) c) Análisis de la viabilidad post-radiación de los cultivos de MEFs TP53KO sometidos a 10 Gy y tres pases consecutivos siguiendo el protocolo 3T3 ( $P<0.0001$ ).  $PDLs=log(N_t/N_0)*3,33$ ;  $N_t$ = número de células obtenidas al final del pase.  $N_0$ =número de células sembradas al inicio del pase. Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales, la desviación estándar y la significación estadística (P) (\*= $P<0,05$ , \*\*\*=  $P<0,001$ ).

#### 2.4. El tratamiento con T3 y la sobreexpresión del receptor THR B no inducen daño replicativo.

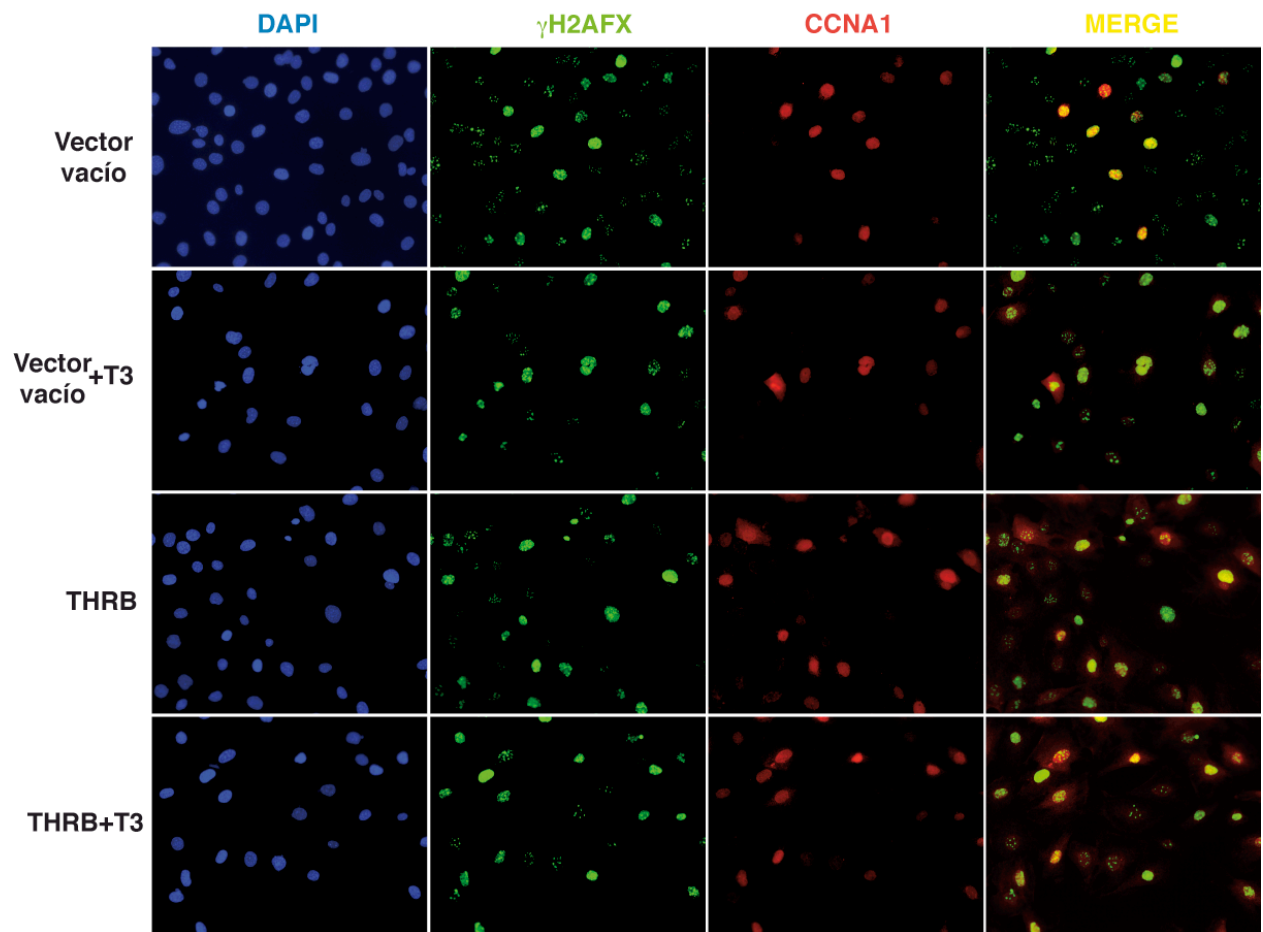
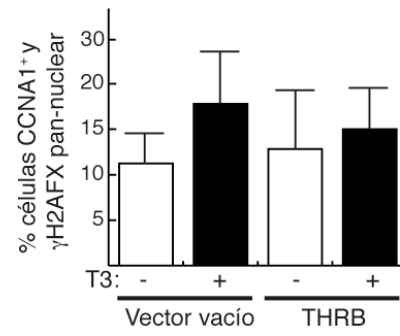
El estrés replicativo hace que las horquillas de replicación progresen lentamente o que incluso se puedan colapsar, pudiendo producir daño en el ADN e inestabilidad cromosómica. Las roturas de cadena simple en el ADN (*single-strand breaks*, SSBs) durante la replicación pueden convertirse eficientemente en DSBs de forma espontánea, o bien como consecuencia de su reparación o por el colapso de las horquillas (113). Con el objetivo de analizar si los focos de daño al ADN observados pudieran ser consecuencia de un daño replicativo, analizamos la incidencia de células doblemente marcadas con  $\gamma$ H2AFX y CCNA1 (CICLINA A), un marcador de la fase S del ciclo celular. Durante la fase S, los niveles de expresión CCNA1 aumentan

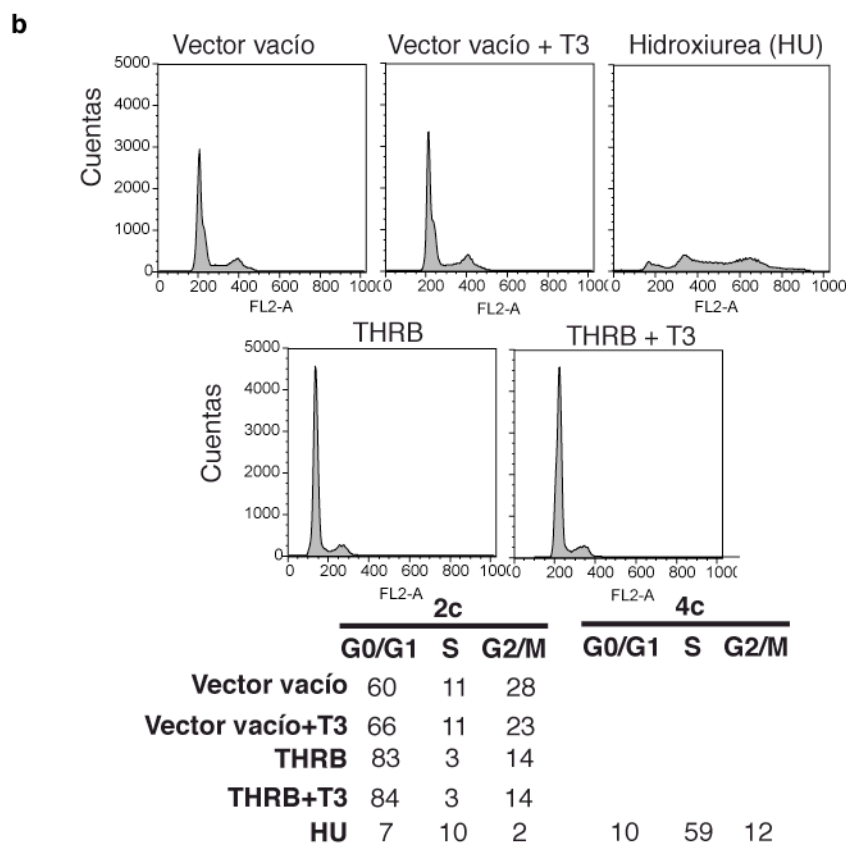


considerablemente porque su unión a CDK2 es requerida para la progresión a través de esta fase. Las células que sufren un fuerte daño replicativo presentan un patrón de expresión de  $\gamma$ H2AFX *pan-nuclear* (que abarca todo el núcleo) (87), similar al observado en la Fig. 3c con TP53BP1 en las células que expresan RAS<sup>Val12</sup>.

Como se muestra en la Fig. 10a, no observamos diferencias significativas en nuestras condiciones experimentales en la incidencia de células con un patrón de expresión *pan-nuclear* de  $\gamma$ H2AFX y que además muestran altos niveles de expresión de CCNA1, que abarcó un 10-15% de la población. Por otro lado, la sobreexpresión de THRB y el tratamiento con T3 conduce a un bloqueo significativo de células en la fase G0/G1, que no se corresponde con el observado en células sometidas a un estrés replicativo, como ocurre tras el tratamiento con hidroximetilurea, un agente químico que inhibe la replicación del ADN induciendo una parada celular en la fase S principalmente en la población de células tetraploides (Fig. 10b).

a





**Figura 10. Incidencia de daño replicativo en MEFs TP53KO.** a) Micrografías representativas de inmunofluorescencia indirecta doble de  $\gamma$ H2AFX y CCNA1. Se cuantificó el porcentaje de células que presentaban una expresión *pan-nuclear* de  $\gamma$ H2AFX (que abarcaba todo el núcleo) y altos niveles de expresión de CCNA1, después del primer pase de cultivos (3 días) en las distintas condiciones experimentales (sobreexpresión o no de THRB, en ausencia y presencia de T3 5 nM) ( $P=0,4839$ ). Magnificación de las micrografías, 200X. b) Perfil de ADN obtenido por citometría de flujo en células control o que sobreexpresan THRB en presencia o ausencia de T3 (5 nM). Como control positivo experimental se empleó el tratamiento con hidroxiurea (1  $\mu$ M) durante 24 horas. c: número haploide de cromosomas.

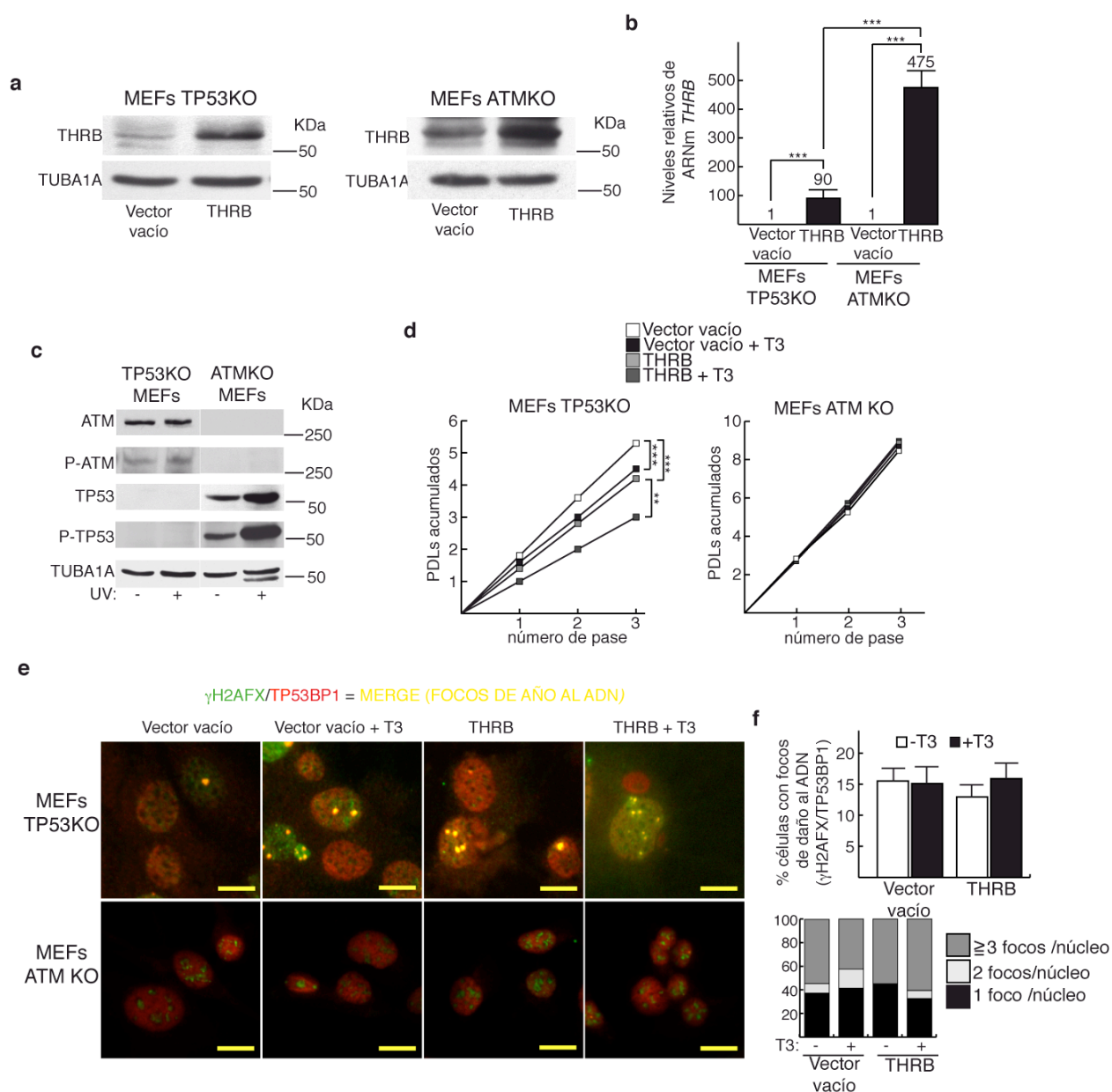
## 2.5. Efecto de la T3 y de la expresión de THRB en MEFs deficientes en ATM (ATMKO).

Como hemos comentado anteriormente, ATM es una quinasa imprescindible como sensor de DSBs y para la señalización intracelular que conduce a su reparación. En función de los resultados anteriores que demostraban la presencia de DSBs inducidos por la hormona y THRB, nos planteamos analizar la incidencia de DSBs, la senescencia y la capacidad proliferativa de las células deficientes en ATM en presencia y ausencia de T3 y THRB.

La expresión de THRB en los transfectantes estables generados se confirmó por *western-blotting* y PCR cuantitativa. Como se muestra en las **Figs. 11a y 11b**, los niveles de expresión de THRB alcanzados en los MEFs ATKO fueron relativamente más altos que los que se obtuvieron en los MEFs TP53KO, tanto a nivel de proteína como de ARNm. También

observamos que los ATMKO expresaban mayores niveles de THRB endógeno (correspondiente al carril de vector vacío) que los MEFs TP53KO. A continuación, quisimos analizar los niveles tanto de expresión como de activación por radiación UV-C (254 nm) de TP53 y ATM en los MEFs TP53KO y ATMKO (Fig. 11c), lo que confirmó que estas células expresan ATM y TP53, respectivamente.

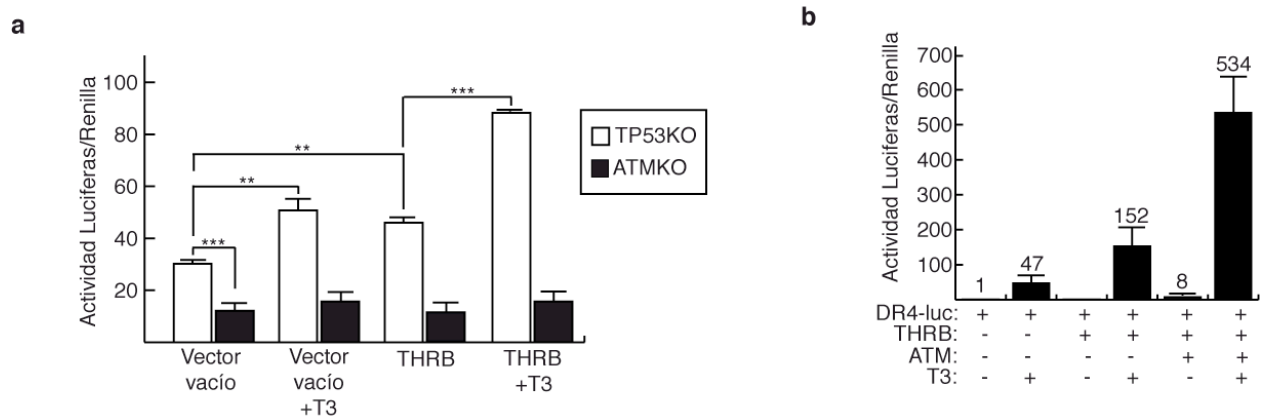
Sin embargo, sorprendentemente, ni la exposición a T3 ni la sobreexpresión de THRB, condujeron a una inhibición significativa de la proliferación en MEFs ATMKO (Fig. 11d). De la misma forma, ni la hormona T3 ni la sobreexpresión de THRB dieron lugar a un aumento en la formación de focos de daño al ADN que contenían TP53BP1 y  $\gamma$ H2AFX (Fig. 11e), ni a la aparición de senescencia celular ya que el número de células positivas para SA- $\beta$ gal fue negligible en todas las condiciones (datos no mostrados). El análisis cuantitativo de estos focos indicaba que los MEFs ATMKO mostraban un porcentaje basal de células que contenían focos (alrededor del 12%) similar al de los MEFs deficientes en TP53, que no aumentó con el tratamiento con T3 o la sobreexpresión de THRB (Fig. 11f). Estos resultados nos permitieron confirmar que el daño infligido en el DNA por la sobreexpresión THRB y la T3 consistía en DSBs y que la quinasa ATM es esencial, no sólo para la aparición de este daño, sino para la inhibición proliferativa y la inducción de senescencia inducida por la T3 y THRB.



**Figura 11. Efecto de la hormona T3 y THR en MEFs deficientes de ATM (ATMKO).** **a)** Comparación entre los niveles de expresión de THR alcanzados en los cultivos estables generados en MEFs TP53KO y ATMKO. Como control de carga utilizamos la proteína TUBA1A ( $\alpha$ -tubulina). **b)** Comparación entre los niveles de ARNm de THR en los mismos cultivos ( $P < 0,0001$ ). **c)** Comparación de los niveles de activación y de expresión de TP53 y ATM en MEFs TP53KO y ATMKO. Las células creciendo en placas de p150 (80% confluencia) se irradiaron con  $80 \text{ kJ/m}^2$  de UV-C (254 nm). Después de 3 horas post-radiación las células se lavaron con PBS 1X y se procesaron para ser analizadas por inmunotransferencia. **d)** Comparación de la capacidad proliferativa entre los cultivos estables generados en MEFs TP53KO y ATMKO, en presencia o ausencia de T3.  $PDLs = \log(N_f/N_0) \times 3,33$ ;  $N_f$  = número de células obtenidas al final del pase.  $N_0$  = número de células sembradas al inicio del pase. ( $P < 0,0001$ ). **e)** Análisis de la formación de focos de daño al ADN que contienen  $\gamma$ H2AFX y TP53BP1 después del tercer pase, en MEFs TP53KO y ATMKO (magnificación: 400X). **f)** Cuantificación de los focos, después del tercer pase, en los cultivos estables generados en MEFs ATMKO. Se muestra el porcentaje de células que contienen focos así como el número de focos por núcleo (porcentaje de células con 1, 2 o más de 3 focos). Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales, la desviación estándar y la significación estadística ( $P$ ) (\*\*=  $P < 0,01$  y \*\*\*=  $P < 0,001$ ).

En función de estos resultados, evaluamos también la capacidad transcripcional mediada por THRB en ausencia o presencia de ATM. Para ello, empleamos la transfección transitoria de un vector reportero de luciferasa que contiene el elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) en su configuración DR4. En MEFs TP53KO, la incubación con hormona aumentó significativamente la expresión del gen reportero y este aumento fue aun mayor tras la sobreexpresión de THRB. Sin embargo, en ausencia de ATM, ni la hormona ni la expresión de THRB fueron capaces de estimular significativamente la actividad del gen reportero en este tipo de ensayo (**Fig. 12a**). Adicionalmente, nos planteamos a continuación evaluar el efecto de la sobreexpresión de ATM sobre la capacidad transcripcional del THRB en células 293T transfectadas transitoriamente con el vector reportero y vectores de expresión que codifican por THRB y/o ATM. Como se muestra en la **Fig. 12b**, la expresión de ATM aumentó significativamente la transactivación dependiente de ligando y los mayores niveles de actividad luciferasa, de más de 500 veces respecto al control, se encontraron en células que sobreexpresaban THRB y ATM y fueron tratadas con T3.

En su conjunto, estos resultados indican que ATM es esencial para las acciones de la T3 y THRB sobre proliferación celular, daño genómico y senescencia celular y, por otro lado, sugieren una nueva función de ATM en la actividad transcripcional de THRB, como un potencial corregulador de estos receptores nucleares.



**Figura 12. Efecto de la hormona T3 y THRB en MEFs deficientes de ATM (ATMKO).** **a)** Ensayo de actividad luciferasa en MEFs TP53KO y ATKMO transfectados transitoriamente con los vectores pTK-DR4-luciferasa y pRL-TK-Renilla, en ausencia o presencia de T3 (5 nM, 16 horas) ( $P < 0,0001$ ). **b)** Ensayo de actividad luciferasa en HEK 293T transfectadas transitoriamente con los vectores pTK-DR4-luciferasa, pRL-TK-Renilla y pcDNA3-flagATM, en ausencia y presencia de T3 (5nM, 16 horas). Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales, la desviación estándar y la significación estadística ( $P$ ) (\*= $P < 0,05$ , \*\*= $P < 0,01$  y \*\*\*= $P < 0,001$ ). Y en este caso, además, se han representados dos experimentos distintos y el error estándar de la media (S.E.M.).

### 2.6. Análisis del daño oxidativo y de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

La aparición de daño genómico promovido por la hormona y la expresión THRB sugiere un origen endógeno del mismo, debido probablemente a sus efectos sobre el metabolismo de la célula. Como se ha comentado en la introducción, la hormona T3 regula el consumo de oxígeno (288, 289) y la función mitocondrial, y se ha descrito que es capaz de producir ROS en varios sistemas celulares (301). Estas moléculas son altamente reactivas y se han asociado a alteraciones químicas en el ADN, mutaciones e inestabilidad cromosómica. Las mitocondrias son la principal fuente de ROS intracelular. Se ha estimado que aproximadamente el 1-2 % de los electrones que pasan por la cadena transportadora de electrones reaccionan con oxígeno molecular para producir el anión superóxido, la ROS predominante en mitocondria.

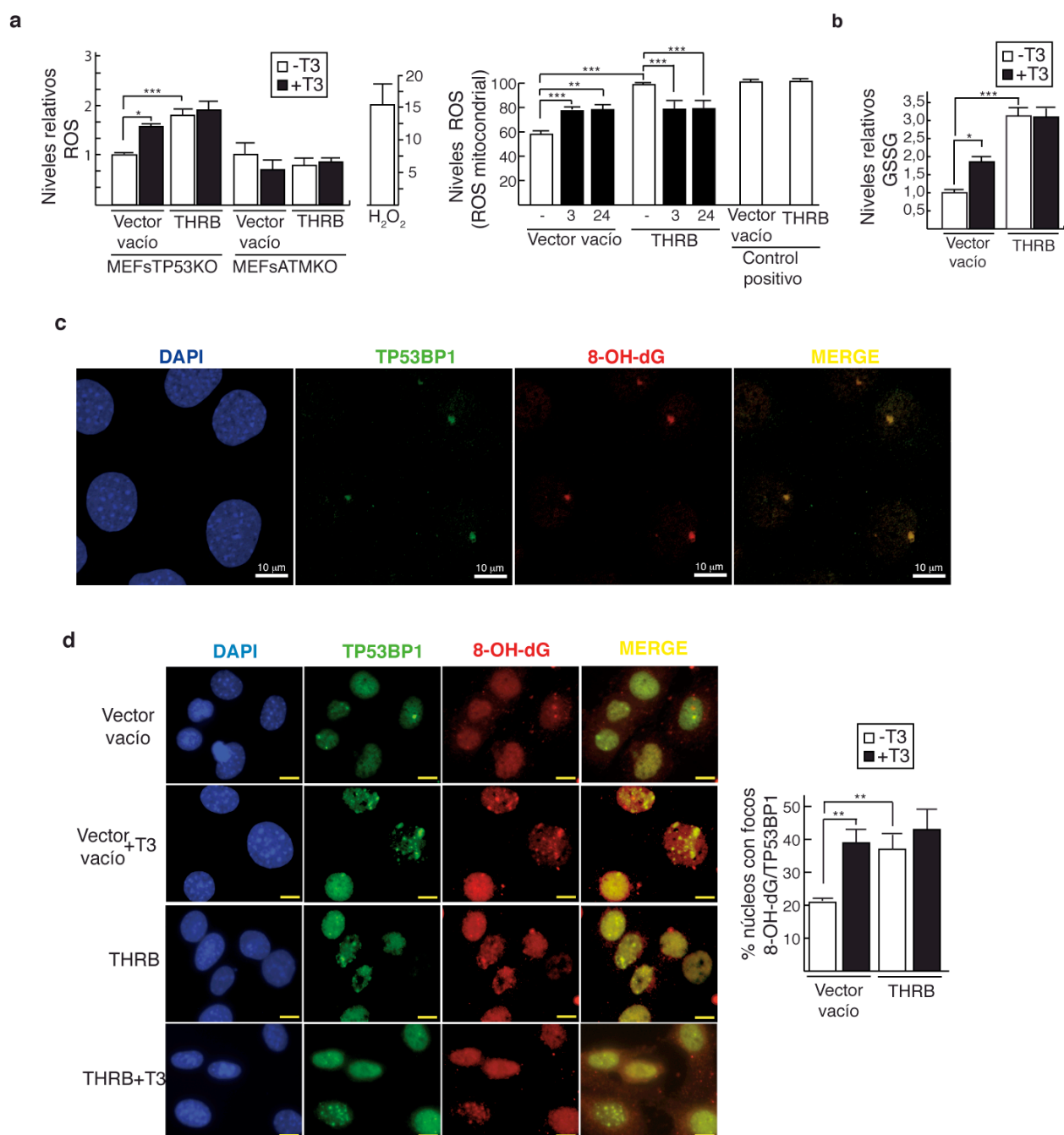
Para determinar si el origen del daño observado en MEFs estaba relacionado con la producción de ROS, abordamos el análisis de ROS y la aparición de daño oxidativo en el ADN.

La medición de ROS la llevamos a cabo, en primer lugar, empleando la sonda fluorescente 2', 7' diclorofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA), ampliamente utilizada en este tipo de estudios. En MEFs TP53KO, el tratamiento con hormona y la expresión de THRB son capaces de inducir la producción de ROS de forma significativa. Sin embargo, ni la hormona ni THRB son capaces de inducir ROS en los MEFs ATMKO. Para determinar si el origen de ROS era de origen mitocondrial empleamos la sonda fluorescente *Mitosox*, un agente altamente selectivo por la mitocondria y por el anión superóxido. De forma similar a la anterior sonda, la hormona y la expresión de THRB fueron capaces de incrementar los niveles de ROS mitocondriales de forma significativa (**panel derecho, Fig. 13a**). Los niveles relativos de ROS obtenidos en las células que expresan THRB son muy similares a los que presentan las tratadas con *Paraquat*, utilizado como control positivo, pero es importante apuntar que sin embargo, la intensidad de la sonda en estos último era mucho mayor. A continuación, determinamos los niveles de glutatión (GSH), un antioxidante que protege a las células de las ROS y un indicador del estado de reducción/oxidación de la célula. Como se muestra en la **Fig. 13b** el tratamiento de tres horas con hormona aumentó en los niveles de GSSG, la forma oxidada de la glutatión. Los niveles de ésta están constitutivamente elevados en las células que sobreexpresan THRB y no aumentaron significativamente tras el tratamiento con hormona.

Para determinar la incidencia de daño oxidativo en el ADN, analizamos la presencia de la base oxidada 8'-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OH-dG), que se origina por las ROS y que es ampliamente utilizada como biomarcador de daño oxidativo en el ADN. En primer lugar analizamos mediante microscopía confocal la distribución de la proteína TP53BP1 y de 8-OH-dG. Como se muestra en la **Fig. 13c**, la proteína TP53BP1 y 8-OH-dG colocalizan perfectamente en la mayoría de los focos de daño al ADN observados. El número de estos

focos aumentó tras solamente 3 horas de tratamiento con T3 y con la sobreexpresión de THRB en MEFs TP53KO (**Fig. 13d**). Estos resultados en su conjunto nos indicaron que la producción de ROS, muy probablemente de origen mitocondrial, inducido por la hormona y el THRB son los responsables de la inducción de los focos de daño observados y que éstos aparecen a tiempos tempranos de tratamiento con la hormona.

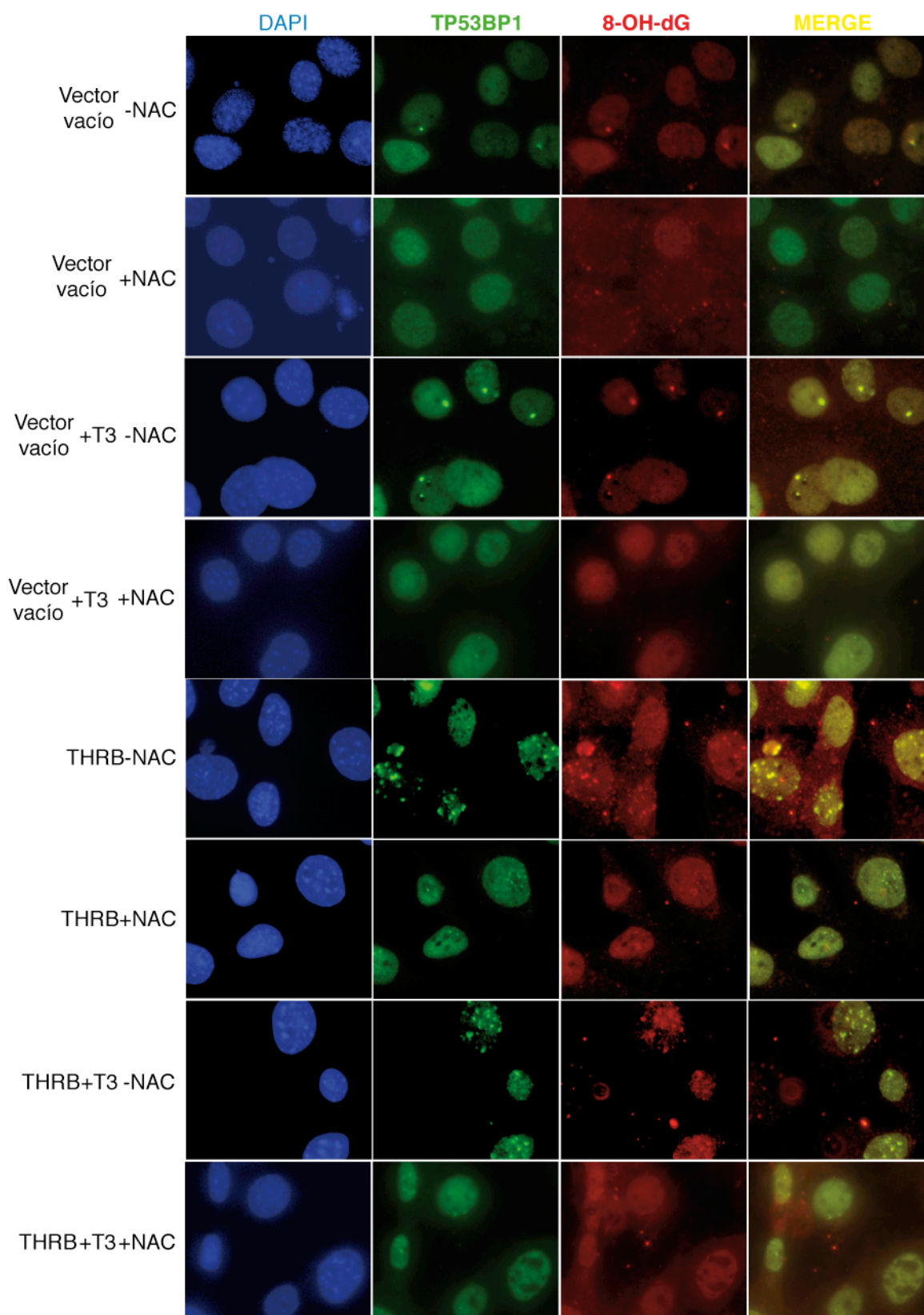




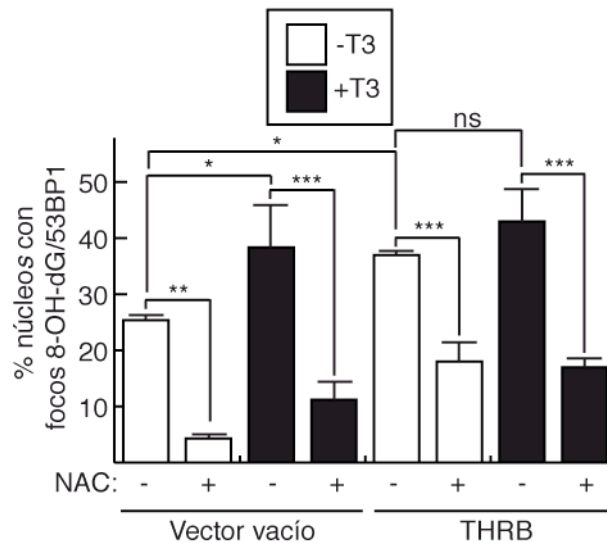
**Figura 13. Análisis de ROS y de focos que contienen TP53BP1 y 8-OH-dG.** **a)** Panel izquierdo: Niveles de ROS observados en MEFs TP53KO y ATMKO empleando la sonda diclorofluoresceína diacetato y fluorimetría. El tratamiento con hormona fue de 3 horas ( $P=0,0022$ ). El tratamiento de 2 horas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) se utilizó como control positivo (observar que los valores del eje son diferentes). Panel derecho: análisis de ROS mitocondrial empleando la sonda *Mitosox* y citometría de flujo, después de 3 ó 24 horas de tratamiento con T3 de los cultivos estables generados en MEFs TP53KO. Como control positivo empleamos el tratamiento con el agente Paraquat (0,1 mM) (ver mat&met) ( $P<0,0001$ ). **b)** Medición de los valores relativos de glutatión oxidada (GSSG) en los cultivos estables de MEFs TP53KO tratados o no durante tres horas con T3 (5 nM) ( $P=0,0006$ ). Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales, el error estándar de la media (S.E.M.) de dos experimentos distintos y la significación estadística ( $P$ ) (\*= $P<0,05$ , \*\*= $P<0,01$  y \*\*\*= $P<0,001$ ). **c)** Análisis por microscopía confocal de la cofocalización de los focos de daño al ADN que contienen TP53BP1 y 8-OH-dG, en MEFs TP53KO que expresan THRB. Magnificación de las micrografías: 600X. **d)** Micrografías representativas de inmunofluorescencia indirecta de TP53BP1 y 8-OH-dG en los cultivos estables de TP53KO que sobreexpresan THRB o no, en presencia y ausencia de ligando (5 nM, 3 horas). Magnificación de las micrografías 400X y escalas de 10  $\mu$ m. **d)** Cuantificación de focos de daño al ADN que contienen TP53BP1 y 8-OH-dG, en los cultivos estables generados en MEFs TP53KO ( $P=0,0003$ ). Se cuantificaron al menos 200 células en cada una de las condiciones experimentales. Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales, la desviación estándar y la significación estadística ( $P$ ) (\*= $P<0,05$ , \*\*= $P<0,01$  y \*\*\*= $P<0,001$ ).

Para confirmar que el daño observado es de origen oxidativo, tratamos las células con el agente antioxidante NAC (N-acetilcisteína) antes de la incubación con T3 y durante la duración de la misma, en las diferentes condiciones experimentales. De forma consistente e inequívoca, el tratamiento previo con NAC redujo drásticamente el número de focos de daño que contienen ADN oxidado (TP53BP1 y 8-OH-dG), inducidos por THRB y el tratamiento hormonal (**Fig. 14a**). La cuantificación del porcentaje de células que presentan focos demostró otra vez que la T3 aumentó su número de forma significativa al corto tiempo utilizado (3 horas) y que el NAC disminuyó de forma muy potente el número de células que presentan focos, aunque la disminución no fue total, pudiéndose observar todavía unos niveles basales de focos "resistentes" al tratamiento con NAC (**Fig. 14b**).

**a**



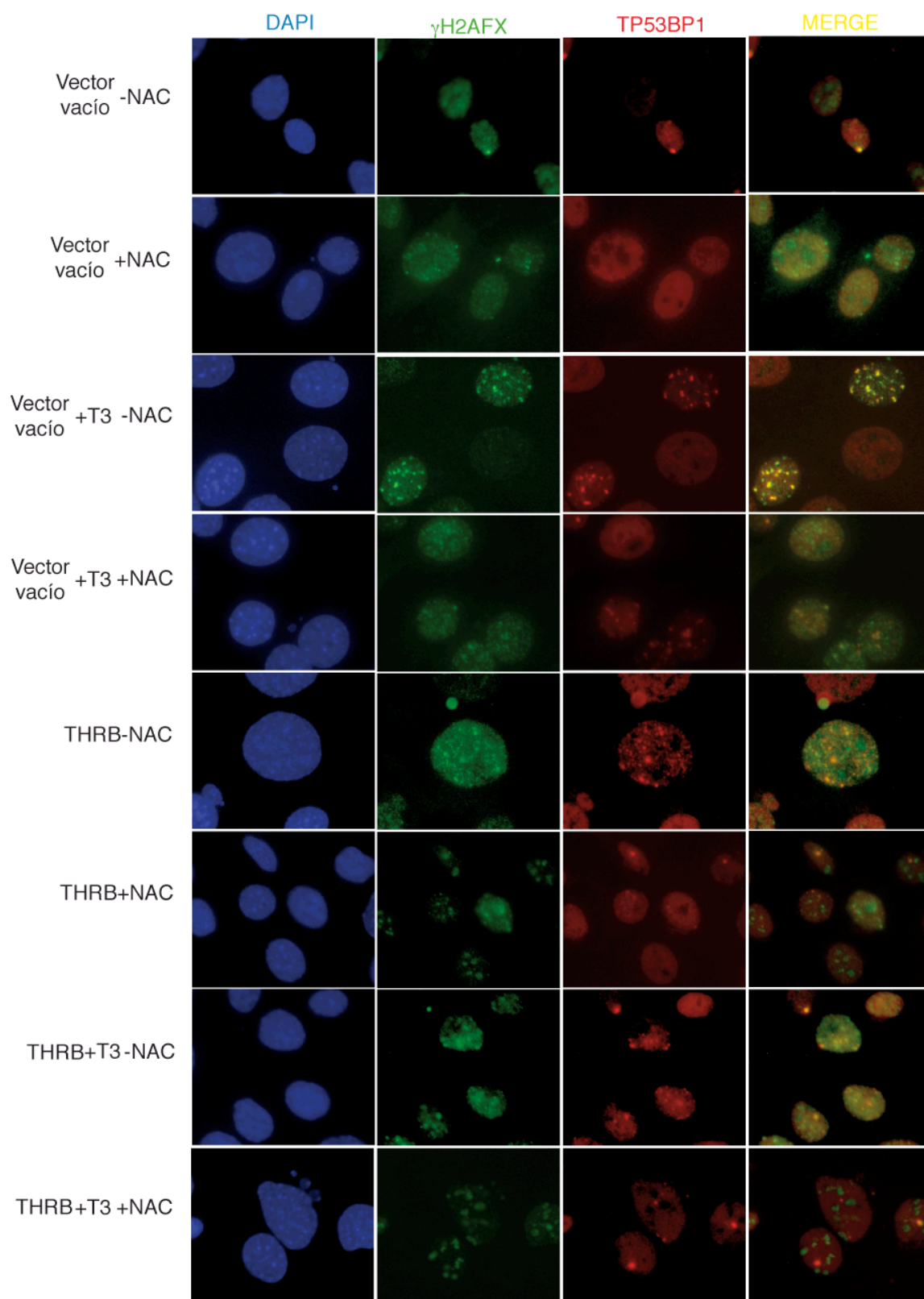
b

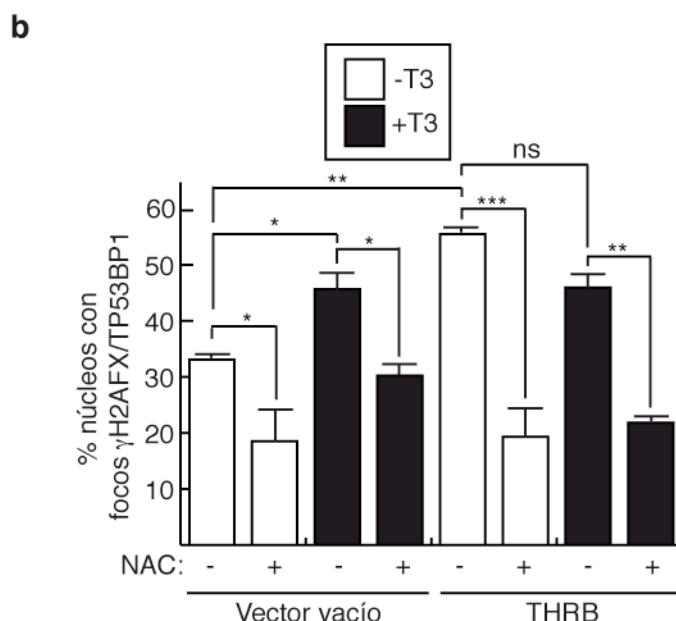


**Figura 14. Análisis de focos de daño al ADN que contienen 8-OH-dG y TP53BP1, tras el tratamiento con el agente antioxidante N-acetilcisteína (NAC).** a) Micrografías representativas de doble inmunofluorescencia (TP53BP1 y 8-OH-dG) en MEFs TP53KO tratados o no con NAC 5 mM. El tratamiento con NAC se inició dos horas antes de la incubación con hormona (3 horas, 5 nM). Magnificación de las micrografías: 400X. b) Cuantificación de focos de daño al ADN que contienen TP53BP1 y 8-OH-dG, en MEFs TP53KO tratados con NAC o no (vehículo), antes de la adición de hormona T3 (5 nM) ( $P < 0,0001$ ). Se cuantificaron al menos 200 células en cada una de las condiciones experimentales. Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales, la desviación estándar y la significación estadística ( $P$ ) (\*= $P < 0,05$ , \*\*= $P < 0,01$  y \*\*\*= $P < 0,001$ ).

A continuación analizamos la presencia de focos de daño que contenían  $\gamma$ H2AFX y TP53BP1 en presencia y ausencia de NAC (Fig. 15a). De nuevo se detectó el aumento temprano de focos inducido por T3 y THR $\beta$ , y también se redujo su número en presencia del antioxidante (Fig. 15b), sobre todo en células que presentaban mayor número de focos por núcleo. El porcentaje de células dañadas después del tratamiento con NAC, aún fue significativo y mayor que el porcentaje de células que contenían 8-OH-dG y TP53BP1, indicando que no todas las lesiones de DSBs observadas en los cultivos contenían 8-OH-dG.

**a**





**Figura 15. Análisis de los focos de daño al ADN que contienen  $\gamma$ H2AFX y TP53BP1, tras el tratamiento con el agente antioxidante N-acetilcisteína (NAC).** a) Micrografías representativas de inmunofluorescencias dobles ( $\gamma$ H2AFX y TP53BP1) en MEFs TP53KO transfectados con el vector vacío y tratados con T3 y/o NAC. El tratamiento con NAC se inició dos horas antes de la incubación con hormona (3 horas, 5 nM). Magnificación de las micrografías: 400X. b) Cuantificación de focos que contienen  $\gamma$ H2AFX y TP53BP1 en MEFs TP53KO transfectadas con vector vacío o THRB y tratadas con NAC o no antes de la adición de hormona T3 (5 nM). Se cuantificaron al menos 200 células en cada una de las condiciones experimentales ( $P < 0,0001$ ). Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales, la desviación estándar y la significación estadística ( $P$ ) (\*= $P < 0,05$ , \*\*= $P < 0,01$  y \*\*\*= $P < 0,001$ ).

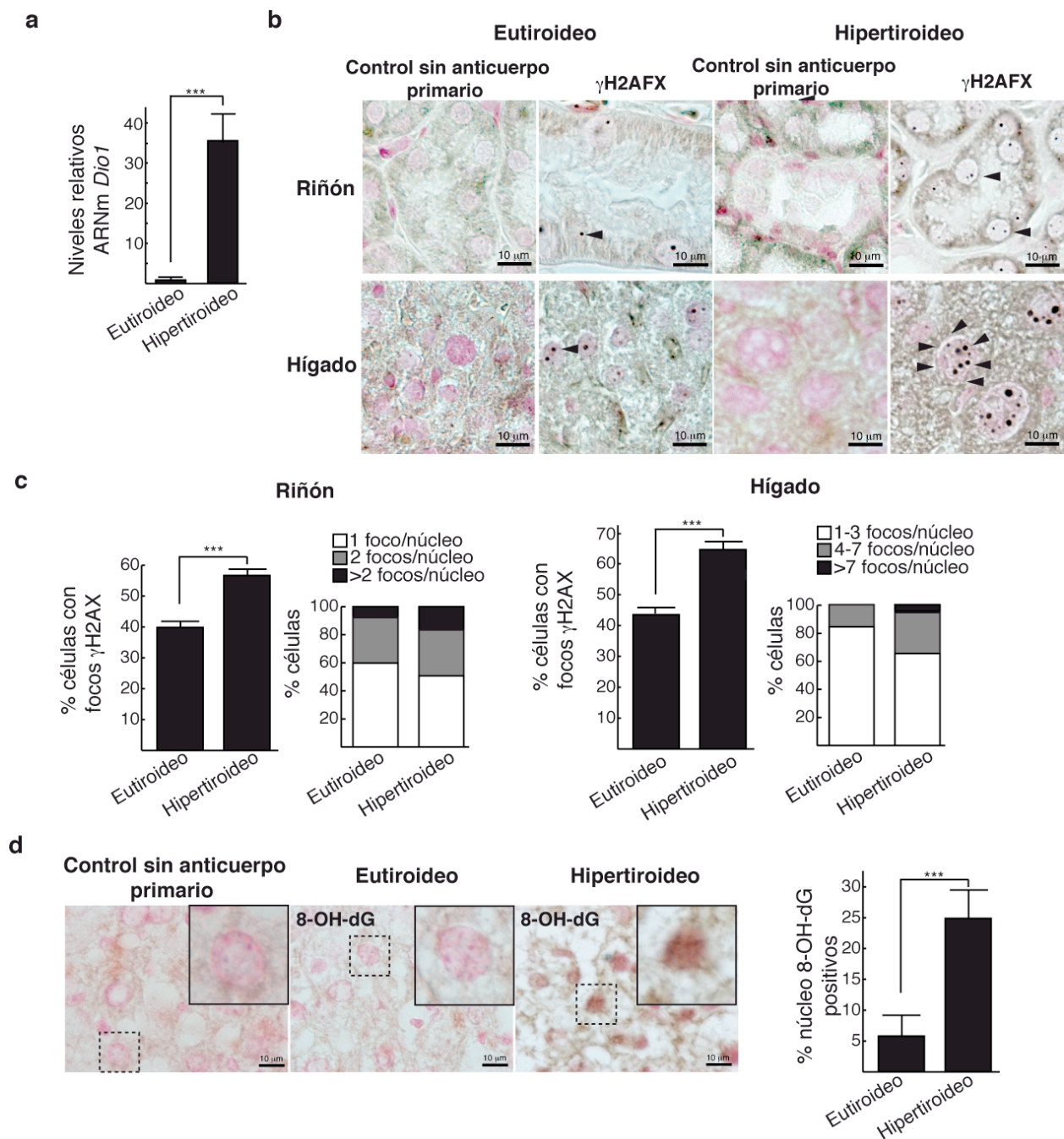
## 2.7. El tratamiento con T3 induce daño genómico *in vivo*.

El tratamiento de animales de experimentación con hormonas tiroideas provoca alteraciones en la función cardiaca, un mayor consumo de oxígeno y cambios en la expresión génica, incluyendo genes asociados a la función mitocondrial. La condición hipertiroides, además, se ha asociado a daño tisular en órganos como el hígado donde se expresan constitutivamente niveles altos de los THRs (178, 301).

Para analizar la aparición de daño genómico *in vivo*, sometimos a ratones a dosis altas de las hormonas T4 y T3 durante un periodo de dos semanas. Después de este tiempo, se recogieron muestras de distintos órganos para examinar la expresión de marcadores de daño genómico. Como se muestra en la Fig. 16a, pudimos comprobar que los ratones tratados expresaban altos niveles hepáticos de expresión de ARNm de *Dio1*. Este gen codifica para la proteína responsable de desiodar la T4 circulante convirtiéndola en T3, principalmente en hígado y riñón (273), y su expresión se considera como un marcador preciso del estado tiroideo (336). De esta forma, por tanto, pudimos comprobar que los ratones tratados eran fuertemente hipertiroides respecto a los no tratados o eutiroideos. En muestras de hígado y riñón,



mediante inmunohistoquímica de tejido fijado con formalina, observamos la formación de focos de daño al ADN que contenían  $\gamma$ H2AFX, con una distribución similar a la observada en células en cultivo aunque de mayor tamaño debido, probablemente, a la actividad enzimática del revelado inmunohistoquímico (**Fig. 16b**). Su cuantificación mostró que la formación de focos conteniendo  $\gamma$ H2AFX fue significativamente más alta en los animales hipertiroideos que en los controles, considerando tanto el porcentaje de células dañadas como en el número de focos de daño por núcleo (**Fig. 16c**). Las muestras procedentes de hígado mostraban además un mayor número de focos que las que procedían de riñón, donde la mayoría de las células expresaban un número pequeño (de 1 a 3 focos por núcleo). Para evaluar la incidencia de daño oxidativo en el ADN utilizamos el anticuerpo anti-8-OH-dG en muestras frescas de hígado congeladas rápidamente en nitrógeno líquido y procesadas para inmunohistoquímica. Como se muestra en la **Fig. 16d**, observamos una reactividad específica de este anticuerpo con una distribución, o bien *pan-nuclear* o en focos discretos y abundantes. De nuevo, en animales hipertiroideos, la aparición de esta lesión en el ADN fue significativamente mayor que en los controles (**panel derecho, Fig. 16c**).



**Figura 16. Las hormonas tiroideas inducen daño genómico *in vivo*.** **a)** Niveles de expresión relativos de ARNm de *Dio1* en el hígado en animales eutiroides e hipertiroides ( $N=6$  para cada condición). **b)** Micrografías representativas de inmunohistoquímica de muestras de riñón e hígado fijadas con formalina y de 4  $\mu$ m de grosor, de ratones control (eutiroides) e hipertiroides. Se muestra la reactividad del anticuerpo contra  $\gamma$ H2AFX y de los controles negativos (sin anticuerpo primario). **c)** Cuantificación de los focos de daño al ADN de  $\gamma$ H2AFX en los tejidos mostrados de los dos grupos de animales. **d)** Inmunohistoquímica del anticuerpo anti 8-OH-dG en muestras frescas congeladas de hígado de ratones eutiroides e hipertiroides (10  $\mu$ m de grosor). Los cuadrados del margen superior derecho corresponden a las zonas ampliadas señaladas con líneas discontinuas. En el panel derecho se muestra la cuantificación de la reactividad del anticuerpo en las dos condiciones experimentales. Magnificación de las micrografías: 400X (panel b) o 600X (panel 14d) y escala de 10  $\mu$ m. Se cuantificaron más de 1000 células de cada una de las condiciones experimentales. Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales, la desviación estándar y la significación estadística ( $P$ ) por *two-tailed unpaired student's t-test* (\*= $P<0,05$ , \*\*= $P<0,01$  y \*\*\*= $P<0,001$ ).



### 3. Origen del daño inducido por la T3 y la expresión de THRB: efectos en la función mitocondrial.

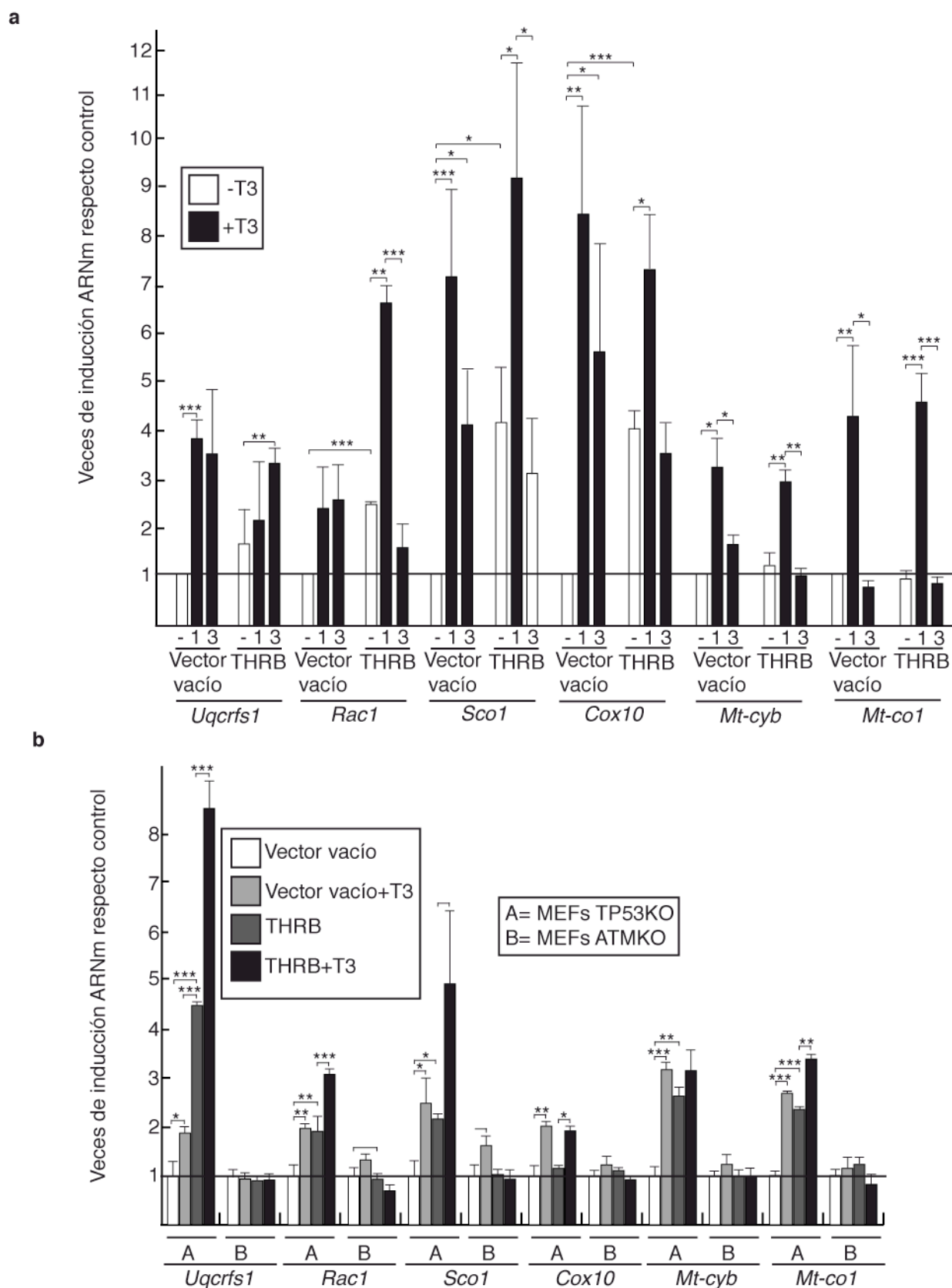
La naturaleza oxidativa del daño genómico observado y el aumento en la producción de ROS implicaba directamente a la mitocondria. Se ha descrito que en ratas hipotiroideas el tratamiento con T3 produce un aumento en el consumo de oxígeno que se debe principalmente a cambios de expresión de genes mitocondriales (288, 289), como parte del proceso de biogénesis mitocondrial. Con estos antecedentes nos planteamos analizar la expresión de algunos genes importantes para la función mitocondrial y la actividad respirométrica de la mitocondria en células intactas.

#### 3.1. El tratamiento con T3 induce la expresión temprana de genes importantes para la función mitocondrial y un aumento en el consumo de oxígeno.

La aparición de focos de daño al ADN y ROS en nuestro sistema son procesos que se observan a las pocas horas de tratamiento con T3, o de forma constitutiva, asociados a la sobreexpresión de THRB. Por ello, en primer lugar analizamos en estas condiciones la expresión de genes representativos que codifican para componentes de la cadena respiratoria: *Uqcrrs1*, componente del complejo III o citocromo b-c1; *Rac1*, que codifica para una de las seis subunidades de la NADPH oxidasa y se ha asociado a la producción de ROS mitocondrial mediante la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; *Sco1*, componente de la citocromo oxidasa c o complejo IV; *Cox10* (subunidad 10 del complejo IV), y de genes codificados por el ADN mitocondrial, como *Mt-cyb*, de la subunidad III del complejo III y *Mt-co1*, subunidad I del complejo IV.

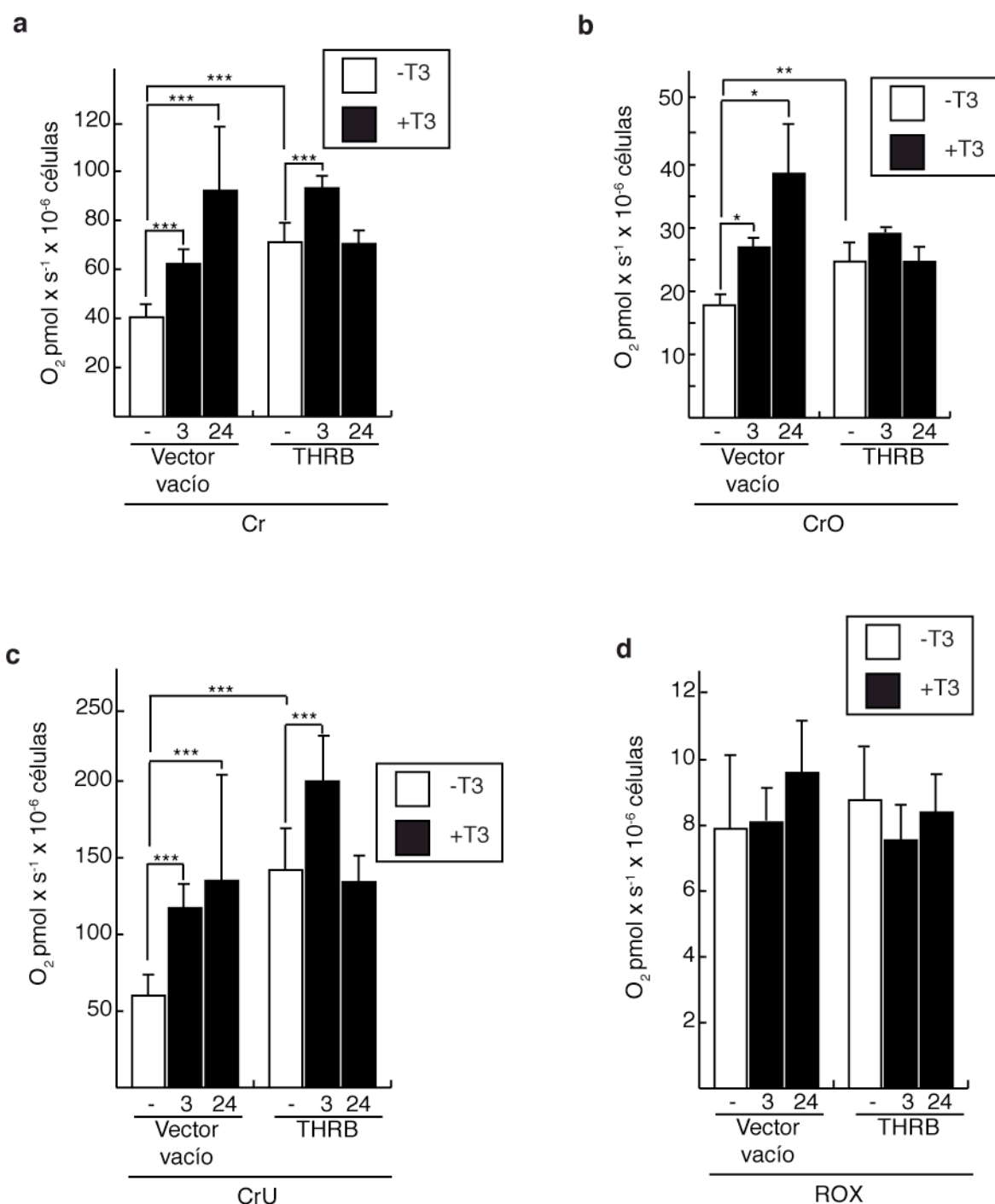
Como se muestra en la **Fig. 17a**, el tratamiento con T3 induce alteraciones tempranas y significativas en la expresión de muchos de estos genes en MEFs TP53KO. En general, la expresión aumenta después de una hora de tratamiento y se mantiene después de 3 horas en la mayoría de los genes analizados, aunque en algunos casos decae de forma drástica después de este tiempo. La sobreexpresión de THRB conduce de forma general y constitutiva a un aumento en la expresión de la mayoría de los genes examinados. En la mayoría de los casos el tratamiento con hormona eleva a su vez la expresión de los mismos pero, en otros casos, los niveles de expresión alcanzados con THRB no se alteran significativamente. En cualquier caso, los cambios de expresión observados en respuesta a la T3 ocurren a un tiempo más temprano de lo que se ha descrito en varios sistemas celulares, sobre todo en hepatocitos (312, 314), donde la primera oleada de expresión génica tras el tratamiento hormonal se ha analizado a las seis horas.

A continuación, examinamos la expresión de estos mismos genes en MEFs ATMKO. Después de una hora de tratamiento con T3 no detectamos cambios significativos en la expresión de estos genes, ni tampoco la sobreexpresión de THRB condujo a la expresión constitutiva de ninguno de los genes analizados (**Fig. 17b**).



**Figura 17. Niveles de expresión de algunos genes implicados en la función mitocondrial. a)** Niveles relativos de expresión de algunos genes representativos de componentes de la cadena respiratoria codificados por el núcleo o la mitocondria. Los niveles de ARNm se determinaron mediante qRT-PCR en MEFs TP53KO después de 1 ó 3 horas de tratamiento con T3 (5 nM) ( $P \leq 0,037$ ). **b)** Comparación entre los niveles de expresión de los mismos genes en MEFs TP53KO y ATMKO, después de una hora de tratamiento con T3 (5 nM) ( $P \leq 0,0012$ ). Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales de tres experimentos independientes, el error estándar de la media (S.E.M.) y la significación estadística ( $P$ ) (\*= $P < 0,05$ , \*\*= $P < 0,01$  y \*\*\*= $P < 0,001$ ).

Estos resultados nos sugerían que las diferencias sustanciales entre dos tipos de MEFs tienen su origen en la diferente respuesta de la mitocondria al tratamiento hormonal y a la sobreexpresión de THRB. Es bien conocido que las THs regulan el consumo de oxígeno en respuesta a la demanda energética de los distintos tejidos. En general, un aumento en los niveles de THs estimula la actividad respiratoria mitocondrial, en contraste con los bajos niveles de respiración celular observados en el hipotiroidismo. Para determinar si los cambios en la expresión génica observados en los MEFs TP53KO conducían a alteraciones funcionales en la mitocondria, realizamos un estudio de respirometría de alta resolución en cultivos de células intactas en las distintas condiciones experimentales (**Fig. 18a,b,c,d**). El tratamiento de las células controles (vector vacío) con T3 durante 3 horas dio lugar a un aumento significativo en los estados respiratorios Cr, CrO y CrU (ver mat&met), y estas diferencias fueron aún mayores después de 24 horas de tratamiento. Sin embargo, el ROX que indica la respiración no mitocondrial obtenida tras la inhibición secuencial de los complejos I y III de la cadena respiratoria, no se vio afectada. Por otra parte, la sobreexpresión de THRB también condujo a un aumento del flujo de oxígeno respecto al control (sin alterar el ROX), y el tratamiento de 3 horas con T3 los incrementó aún más, mientras que tras las 24 horas de incubación con el ligando los niveles en los estados respiratorios no se incrementaban, siendo similares a los que se obtenían en ausencia de T3. En general, los cambios más llamativos ocurrían en la respiración basal (Cr) y en la desacoplada o máxima capacidad respiratoria (CrU).



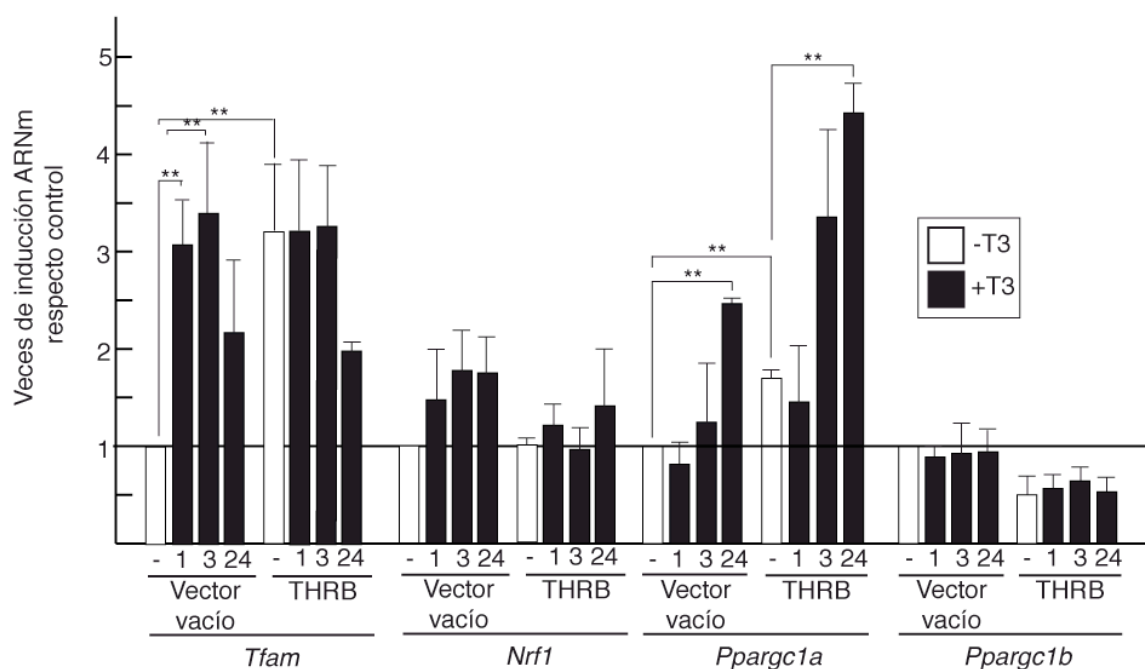
**Figura 18. Estudio de respirometría de alta resolución en células intactas.** a, b, c, d) Estados respiratorios (Cr, respiración basal ( $P<0,0001$ ); CrO, respiración tras inhibir con oligomicina ( $P=0,0011$ ); CrU, respiración tras añadir el desacoplante FCCP ( $P<0,0001$ ); ROX, respiración tras la inhibición secuencial con rotenona y antimicina A obtenidos a partir de células intactas de cultivos de MEFs TP53KO que sobreexpresan THRB o no, y tratados con T3 a los tiempos indicados. Las mediciones se realizaron por pares, y se realizaron al menos tres mediciones independientes por cada condición. Se ha representado el valor medio, la desviación estándar y la significación estadística ( $P$ ) (\*= $P<0,05$ , \*\*= $P<0,01$  y \*\*\*= $P<0,001$ ).

### 3.2. Regulación transcripcional de la mitocondria: efectos de la T3 en la expresión de factores de transcripción. Expresión de sistemas detoxificantes.

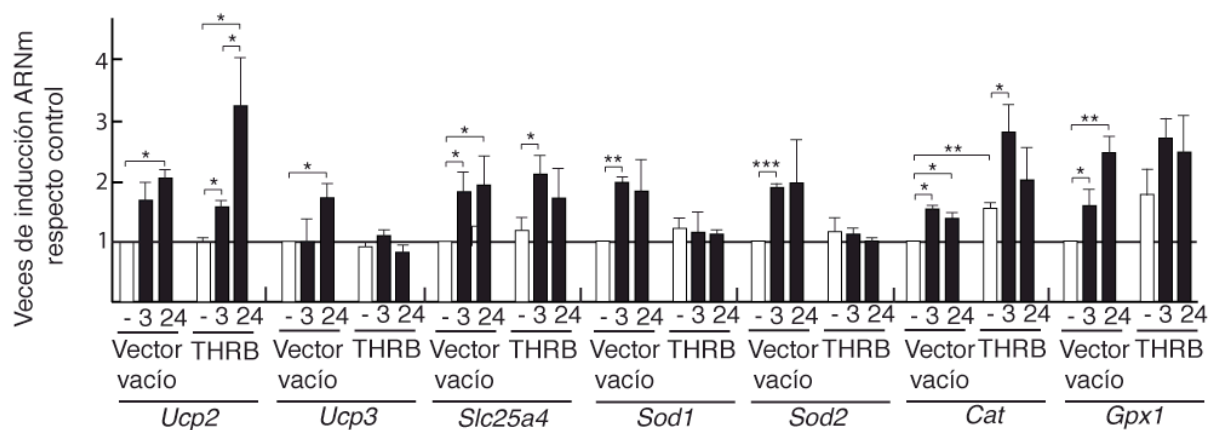
En la regulación de la expresión génica de los genes importantes para la función mitocondrial destacan los factores de transcripción *Tfam* (que es esencial para la replicación y transcripción de genes mitocondriales) y NRF1, así como PPARGC1A (PGC-1 $\alpha$ ) y PPARG1B (PGC-1 $\beta$ ) que, como se ha comentado en la introducción, son coactivadores regulados por las hormonas tiroideas. Como se muestra en la **Fig. 19a**, los niveles de ARNm de *Tfam* aumentaron rápidamente en respuesta al tratamiento con T3 y se encontraban elevados constitutivamente en las células que expresan TRHB, siguiendo un patrón parecido al observado con los genes respiratorios mitocondriales. En cambio, los niveles de ARNm de PPARGC1A sólo aumentaron significativamente después de 24 horas de tratamiento con T3 o débilmente con la expresión de TRHB. Por tanto, la cinética de expresión de PPARGC1A no se pudo asociar a las alteraciones de expresión génica tempranas observadas. En cuanto a los transcritos de PPARGC1B, NRF1 o NRF2 (datos no mostrados) no encontramos cambios significativos a los tiempos de tratamiento hormonal examinados, ni con la expresión de TRHB.

PPARGC1A, por otra parte, es un factor muy importante en la homeostasis de ROS, en cuanto que también regula la expresión de enzimas detoxificantes encargadas de eliminar las ROS de la célula. En MEFs TP53KO, la expresión de algunos de estos sistemas detoxificantes comienza a elevarse, aunque débilmente, a partir de las 3 horas de tratamiento con T3 (**Fig. 19b**). Esto sugiere que estas enzimas están probablemente respondiendo a las ROS inducidas por la T3 y la expresión de TRHB.

a



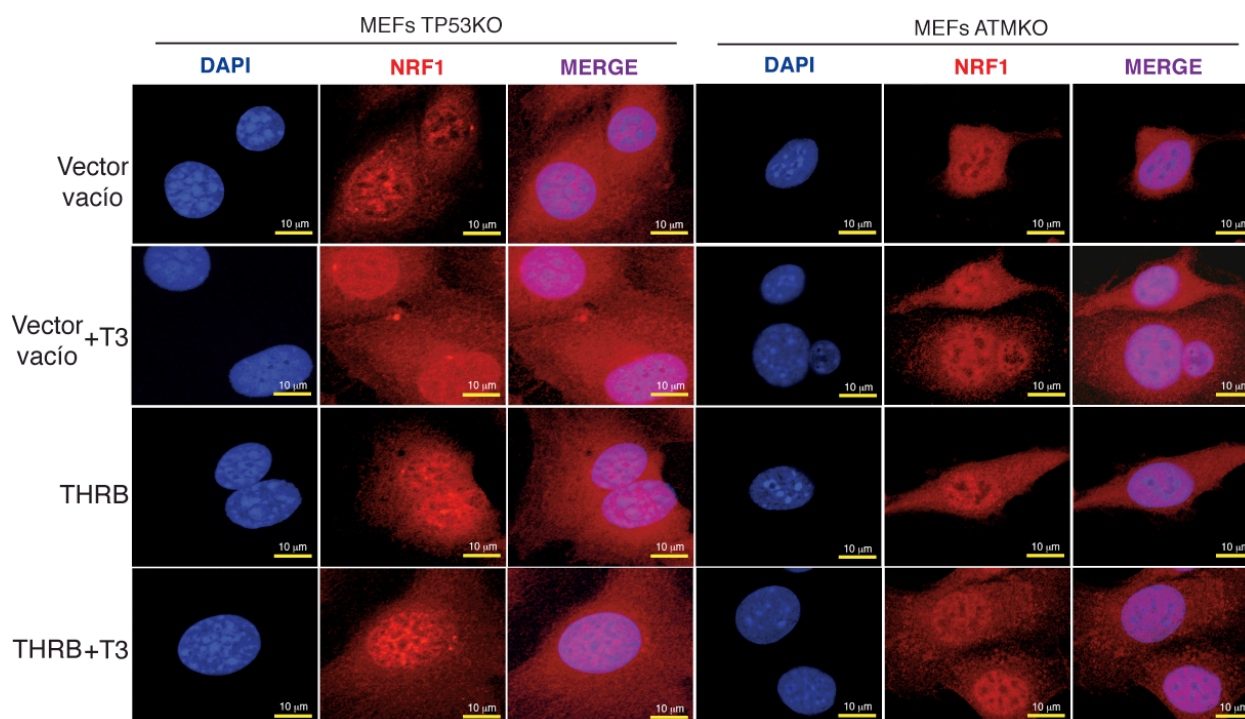
b



**Figura 19. Niveles de expresión génica de factores importantes para la función mitocondrial y de diferentes enzimas detoxificantes de MEFs TP53KO.** a) Niveles de ARNm de los factores de transcripción *Tfam* y *Nrf1* y de los coactivadores *Ppargc1a* y *Ppargc1b* en MEFs TP53KO, que sobreexpresan THR B o no, y tratados con hormona durante 1, 3 y 24 horas. b) Niveles de ARNm de algunos componentes de los sistemas detoxificantes de ROS (*Ucp2*, *Ucp3*, *Slc25a4*, *Sod1*, *Sod2*, *Cat*, *Gpx1*) en MEFs TP53KO. Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales de tres experimentos independientes, el error estándar de la media (S.E.M.) y la significación estadística ( $P$ ) (\*= $P<0,05$ , \*\*= $P<0,01$  y \*\*\*= $P<0,001$ ).

### 3.2.1. El tratamiento con T3 aumenta los niveles de NRF1 y la activación de PRKAA en MEFs TP53KO.

NRF1 es un importante regulador de los genes nucleares requeridos para la transcripción de proteínas mitocondriales, así como de la transcripción y replicación mitocondrial. Es, por tanto, un factor de transcripción esencial para la biogénesis mitocondrial (95, 255, 256, 303). Aunque se ha descrito que la transcripción de NRF1 responde robustamente a T3 dentro de las primeras seis horas de tratamiento en hígado de ratas hipertiroideas e hipotiroideas tratadas con hormonas (298, 314), en nuestro sistema celular, a los tiempos examinados, no observamos un aumento de sus transcritos. Por otra parte, NRF1 está sometido a modificaciones postraduccionales, como fosforilación, que aumentan su estabilidad y su capacidad de unión al ADN (98, 115). Además, se ha descrito en hepatocitos de rata que la activación de NRF1 por daño oxidativo está asociada a una translocación del citoplasma al núcleo (224). Para determinar la distribución celular de NRF1 y si la hormona producía cambios en la misma, examinamos su localización en MEFs mediante microscopía confocal antes y después del tratamiento con T3. Como se muestra en la **Fig. 20**, NRF1 exhibió un patrón de expresión principalmente nuclear que no varió en las distintas condiciones experimentales ni con el tipo de MEFs evaluado.

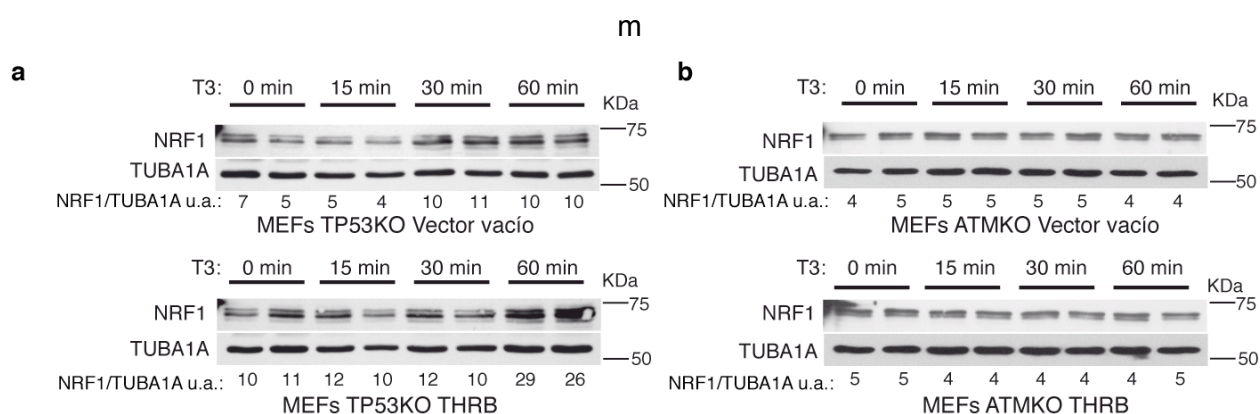


**Figura 20. Localización subcelular de NRF1 en MEFs TP53KO y ATMKO determinada por microscopía confocal.** Micrografías representativas de la expresión de NRF1 en los cultivos estables generados en MEFs TP53KO y ATMKO. El tratamiento hormonal (5 nM) fue de 1 hora. Magnificación de las micrografías: 600X y escala de 10 µm.



A continuación examinamos la expresión de NRF1 mediante *western-blotting* a distintos tiempos después del tratamiento con T3. Como se muestra en la **Fig. 21**, el tratamiento con T3 da lugar a un incremento en la expresión de NRF1 en MEFs TP53KO que comienza a ser evidente a partir de 30 minutos. En las células que sobreexpresan THRB, los niveles de NRF1 que se detectan después de una hora con T3 son aún más elevados que los que se observan al mismo tiempo en los cultivos control (vector vacío). Sin embargo, en los cultivos de MEFs ATMKO, no observamos diferencias significativas en la expresión de NRF1 a los tiempos de incubación indicados.

En función de los resultados mostrados, este incremento en la expresión de NRF1 en MEFs TP53KO inducido por la hormona no se pudo asociar a mecanismos transcripcionales. Como se ha comentado anteriormente, NRF1 está sometido a modificaciones postraduccionales que estabilizan la proteína y aumentan su unión al ADN. Nuestros resultados sugieren que la hormona está induciendo la estabilización de la proteína, probablemente a través de modificaciones postraduccionales, de una forma dependiente de ATM.

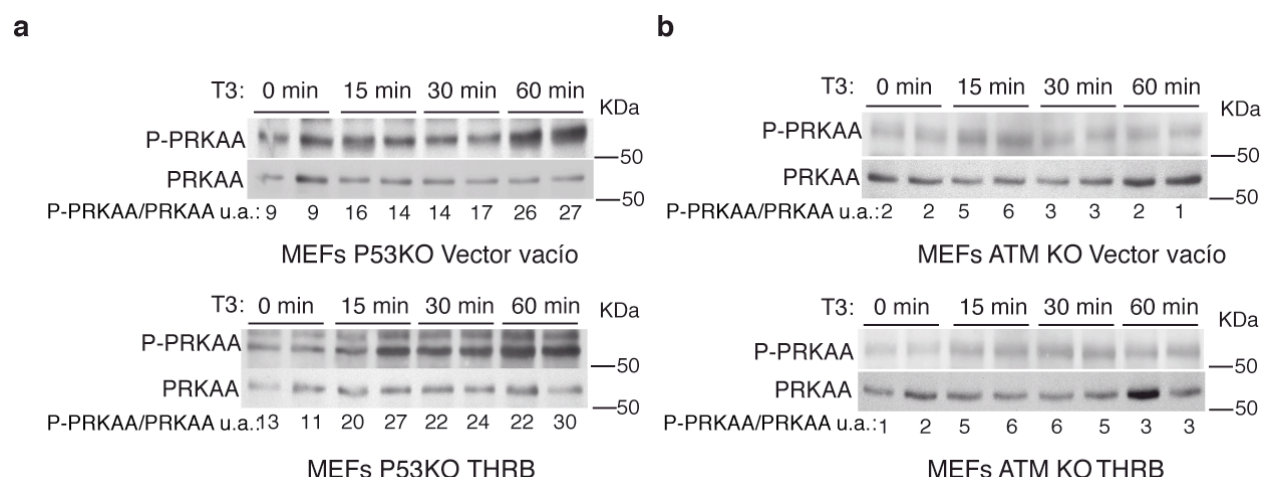


**Figura 21. Niveles de expresión de NRF1 en extractos celulares de MEFs TP53KO y ATMKO.** a) Análisis de NRF1 por *western-blotting* de extractos de celulares de los cultivos generados en los MEFs TP53KO, tratados con hormona a los tiempos indicados. Como control de carga se usó la proteína TUBA1A. b) Análisis de NRF1 por *western-blotting* de extractos celulares de los cultivos generados en los MEFs ATMKO, tratados con hormona a los tiempos indicados. Como control de carga se usó la proteína TUBA1A. Se separaron 30 µg de muestra por carril de duplicados experimentales en geles SDS-PAGE al 8%. Los valores corresponden a la cuantificación del resultado normalizado por TUBA1A (u.a.)

La biogénesis mitocondrial está regulada por el estatus energético de la célula a través de la acción de PRKAA (AMPK, proteína quinasa activada por AMP) (240, 337). PRKAA se estimula alostéricamente por AMP y a continuación se activa mediante fosforilación en la Thr<sup>172</sup> de la subunidad catalítica,  $\alpha$ , por quinasas como STK11 (LKB1) o CAMKK (109, 120, 124, 323). PRKAA fosforila directamente a PPARGC1A (75) y su activación crónica conduce a activación del NRF1 (20). A su vez, PPARGC1A activa la expresión de NRF1 y participa como coactivador de los NRFs para activar la transcripción de genes mitocondriales codificados por el núcleo,

como TFAM o citocromo c (136, 259, 303, 329). Por otro lado, se ha descrito que las hormonas tiroideas pueden regular la actividad de PRKAA, aumentándola en unos casos e inhibiéndola en otros (165, 332). Para determinar si la quinasa PRKAA estaba implicada en nuestros sistemas celulares, examinamos su activación después de tratamientos cortos con T3. Como se muestra en la **Fig. 22**, la hormona T3 induce la rápida fosforilación de PRKAA (P-PRKAA) en los MEFs TP53KO (vector vacío). En los MEFs TP53KO que sobreexpresan THRB la activación de PRKAA es progresiva, comenzando incluso a los 15 minutos de tratamiento con T3, y siendo más elevada que en los controles. En cambio, en los MEFs ATMKO, sólo se detectaron niveles de activación muy débiles en los controles y algo mayores en las células que sobreexpresan THRB, pero muy por debajo a los encontrados en los MEFs TP53KO.

Estos resultados nos indicaron que para la activación completa de PRKAA dependiente de T3 es necesaria la expresión de ATM. En los MEFs ATMKO, aún pudimos detectar una activación débil mediada por la hormona lo que sugiere la existencia de otra vía, independiente de ATM, que conduce a la completa activación de PRKAA dependiente de T3. Como se ha comentado anteriormente, ATM es capaz de promover la biogénesis mitocondrial mediante su acción directa sobre la subunidad  $\alpha$  de la PRKAA, por mecanismos independientes o dependientes de STK11, una quinasa por encima de PRKAA (5, 280, 281). Nuestros resultados sugieren que esta ruta dependiente de ATM es la que está mediando principalmente los cambios de expresión observados en los genes mitocondriales y en la actividad mitocondrial.

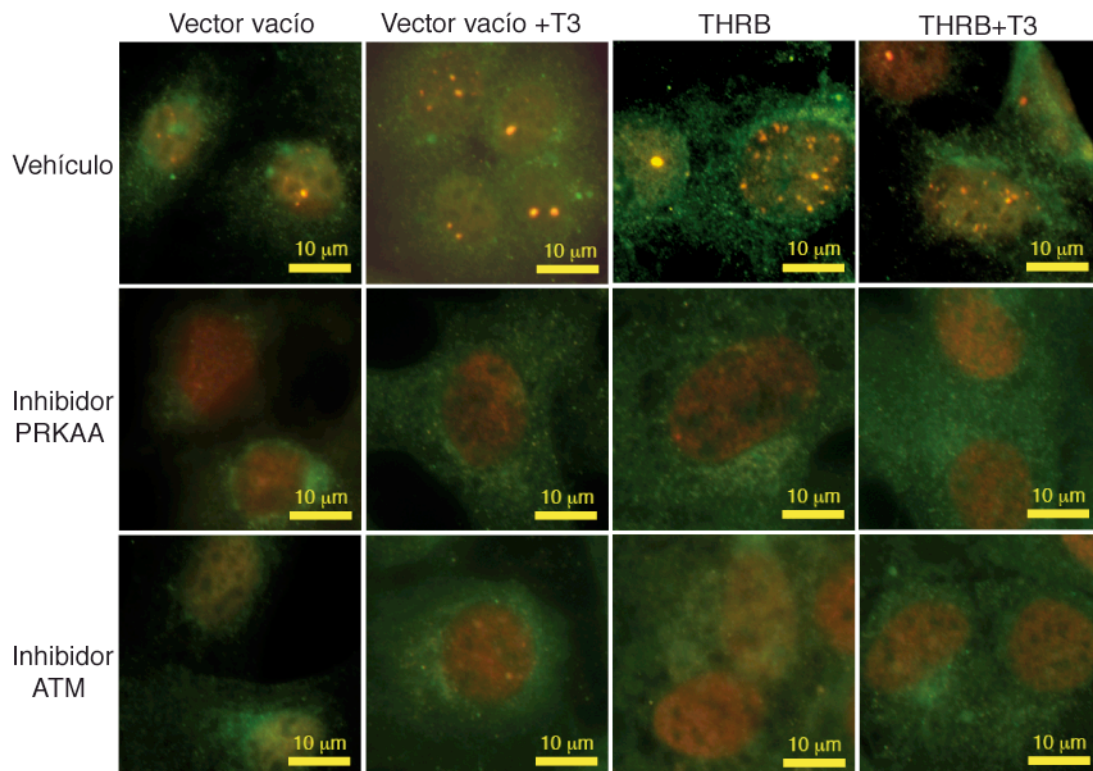


**Figura 22. Niveles de expresión de PRKAA y fosfo-PRKAA (P-PRKAA) en extractos celulares de MEFs TP53KO y ATMKO. a)** Niveles de expresión de PRKAA y su forma activa (P-PRKAA) en los extractos celulares de los cultivos generados en los MEFs TP53KO (que sobreexpresan o no THRB), tratados con hormona a los tiempos indicados. **b)** Niveles de expresión de PRKAA y su forma activa (P-PRKAA) en los extractos celulares de los cultivos generados en los MEFs TP53KO (que sobreexpresan o no THRB), tratados con hormona a los tiempos indicados. Se separaron 30  $\mu$ g de muestra por carril de duplicados experimentales en geles SDS-PAGE al 8%. Los valores corresponden a la cuantificación del resultado normalizado por PRKAA (u.a.).

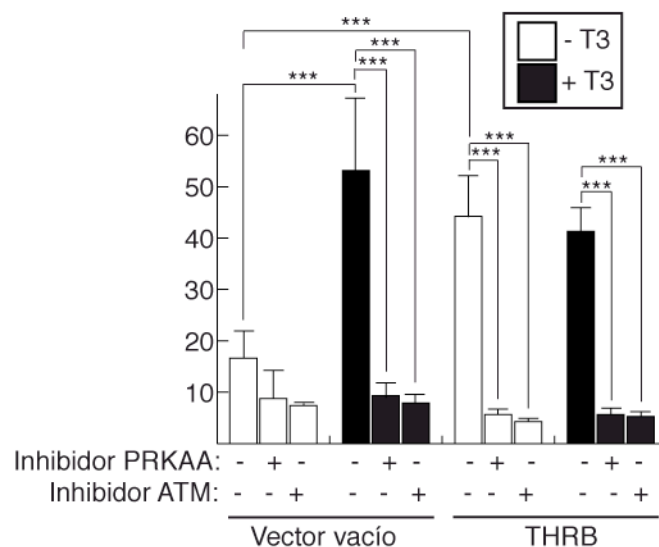
Para comprobar si las quinasas PRKAA y ATM estaban implicadas en la generación de daño de origen oxidativo en nuestro sistema celular, realizamos ensayos de inmunofluorescencia doble indirecta (8-OH-dG y TP53BP1) . Las células tuvieron un tratamiento previo al de la incubación con T3 con *Compound C* y KU-55933, inhibidores de PRKAA y ATM respectivamente, de 2 horas y durante la incubación hormonal (3 horas) (**Fig. 23a**).

De la misma forma que la incubación con el agente antioxidante NAC, el tratamiento previo con estos compuestos produjo una reducción drástica del número de focos de daño que contienen ADN oxidado (8-OH-dG y TP53BP1) inducidos por THRB y T3. La cuantificación del porcentaje de células con focos demostró que los inhibidores de las quinasas PRKAA y ATM reducen de forma significativa el número de células que presentan focos, incluso en las células transducidas con el vector vacío (**Fig. 23b**).

a



b



**Figura 23. Análisis de focos de daño al ADN que contienen 8-OH-dG y TP53BP1, tras el tratamiento con los inhibidores de las quinasas PRKAA y ATM (*Compound C* y *KU-55933* respectivamente).** a) Micrografías representativas de doble inmunofluorescencia (TP53BP1 y 8-OH-dG) en MEFs TP53KO tratados con vehículo, *Compound C* (20  $\mu$ M) y *KU-55933* (15  $\mu$ M). El tratamiento el vehículo y los inhibidores se inició dos horas antes de la incubación con hormona (3 horas, 5 nM). Magnificación de las micrografías 400X y escala de 10  $\mu$ m. b) Cuantificación de focos de daño al ADN que contienen TP53BP1 y 8-OH-dG, en MEFs TP53KO tratados con los inhibidores o no (vehículo), antes de la adición de hormona T3 (5 nM) ( $P < 0,0001$ ). Se cuantificaron al menos 200 células en cada una de las condiciones experimentales. Se ha representado el valor medio de triplicados experimentales, la desviación estándar y la significación estadística ( $P$ ) (\*\*= $P < 0,001$ ).

### 3.2.2. La hormona T3 induce el reclutamiento de NRF1 a promotores de genes importantes para la función mitocondrial.

Las hormonas tiroideas conducen a un aumento en la expresión de genes mitocondriales codificados por el núcleo o el genoma mitocondrial, debido principalmente a su acción sobre factores de transcripción y coactivadores claves para la biogénesis mitocondrial como los mencionados más arriba (PPARGC1A, NRFs, TFAM, etc.). Aunque este mecanismo canónico de activación transcripcional de genes mitocondriales se conoce desde hace tiempo, sobre todo en hígado y en cerebro, los mecanismos generales de activación todavía no se comprenden del todo. Así, no son muchos los genes necesarios para la biogénesis mitocondrial que responden a THs. Además, existe una baja conservación de secuencia en los TREs presentes en los promotores de estos genes, lo que sugiere que existen mecanismos independientes de TREs o eventos secundarios inducidos por la hormona. Nuestros resultados apuntan a acciones rápidas de la T3 sobre la mitocondria, dependientes de ATM, y probablemente mediadas por PRKAA y NRF1. Para estudiar la acción de la hormona sobre genes mitocondriales analizamos, mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), la activación de los promotores de dos genes representativos que respondieron a T3 en los ensayos de RT-qPCR (*Tfam* y *Uqcrrs1*), y la presencia de THRB y NRF1 en los mismos. Cuatro parejas de oligonucleótidos fueron diseñados para examinar varios centenares de pares de bases del promotor de *Tfam*. En la **Fig. 24a** se muestra una ilustración del promotor de *Tfam* donde aparecen las áreas amplificadas por estos oligonucleótidos con respecto al inicio de transcripción del gen y que fueron denominadas I, II, III y IV de forma arbitraria. En la **Fig. 24b** podemos observar que la incubación de una hora con T3 da lugar a una activación del promotor (detectada como un incremento en la acetilación de la histona 3, Acetil. H3F3A) en las áreas más alejadas del inicio de transcripción, más evidente en células que sobreexpresan THRB. De forma progresiva, la acetilación de histona 3 (Acetil. H3F3A) se va acentuando según nos acercamos a las áreas más cercanas al inicio de transcripción (promotor proximal) y es ya muy evidente incluso en los controles (vector vacío) tratados con T3. De forma similar se puede observar que la hormona T3 induce el reclutamiento específico de NRF1 y THRB al promotor de *Tfam*. Este reclutamiento es mucho más evidente en el área IV, el más próximo al sitio de inicio de la transcripción. Estos cambios observados en MEFs TP53KO no se dan en MEFs ATMKO (**Fig. 24b, panel derecho**), ya que no observamos la acetilación de histonas dependiente de T3 en el área IV del promotor de *Tfam*, ni un reclutamiento significativo de NRF1 o THRB.

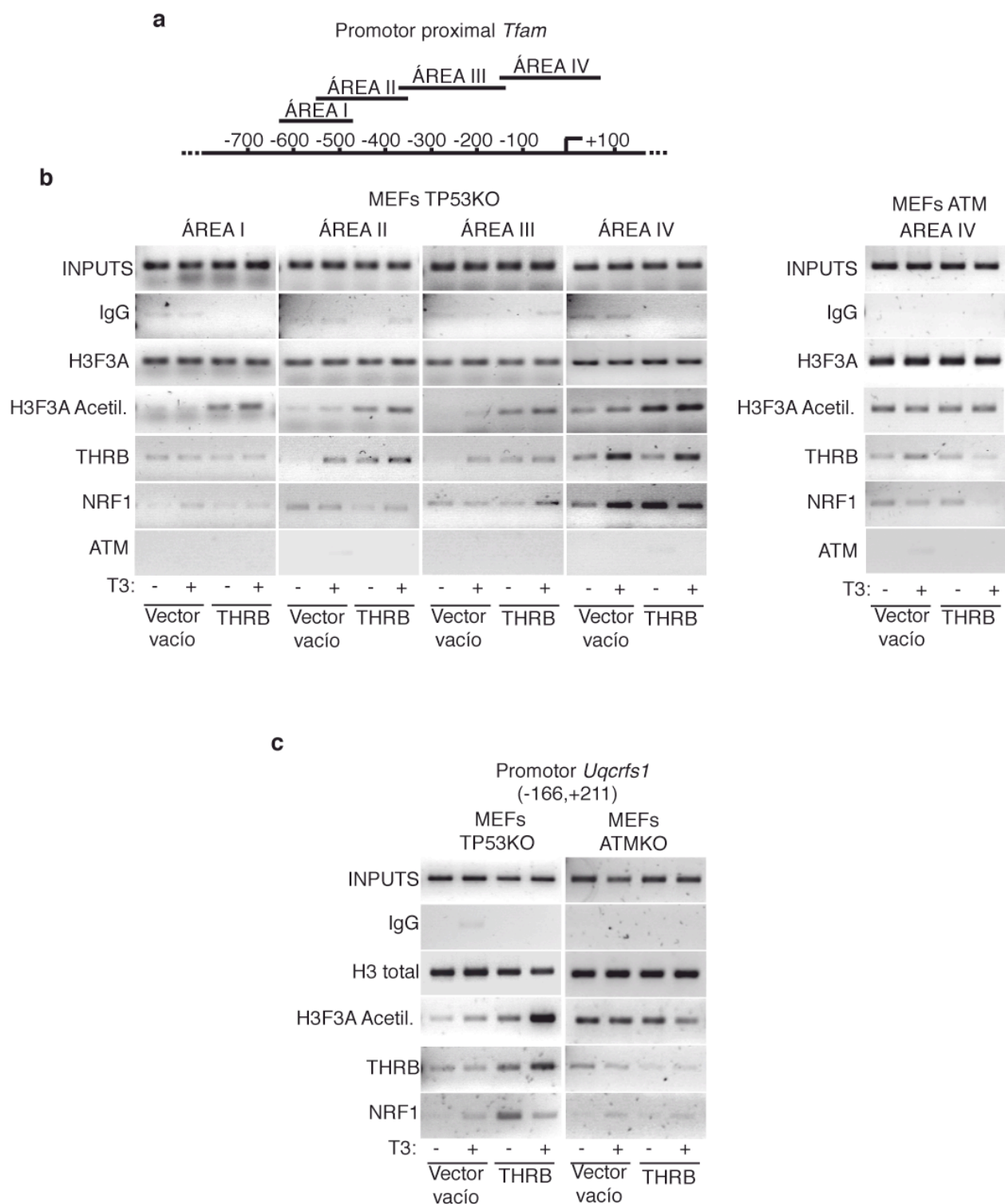
Para comprobar si esto ocurría en otros promotores distintos a *Tfam*, examinamos el promotor de *Uqcrrs1*, otro gen representativo cuya expresión aumentaba después del

tratamiento con T3. Como se observa en la Fig. 24c, el tratamiento de 1 hora con T3 conduce a la activación del promotor de *Uqcrfs1*, sobre todo cuando las células sobreexpresan THRB, siguiendo un patrón que recuerda al perfil de expresión encontrado en el experimento representado en la Fig. 17b. De nuevo, en MEFs ATMKO el promotor *Uqcrfs1* parece resistente a la activación inducida por la hormona. De la misma forma, encontramos que tanto THRB como NRF1 se reclutaban de forma específica al promotor de *Uqcrfs1* de MEFs TP53KO, pero que esto no ocurría en MEFs ATMKO.

Un modelo emergente de activación transcripcional descrito para algunos receptores nucleares como AR, ER y otros factores de transcripción (103, 104, 131) sugiere que durante la misma se producen DSBs mediados por la topoisomerasa II $\beta$  y el reclutamiento de proteínas de reparación del ADN como PARP1, ATM, DNA-PKcs, etc. Se ha sugerido que la acción de estas actividades se requieren para la transcripción eficiente dependiente de esos receptores. En nuestro sistema, utilizando dos anticuerpos distintos, no observamos la inmunoprecipitación de ATM o su reclutamiento específico en ninguna de las condiciones experimentales.

Estos resultados apoyan la idea de que los cambios de expresión tempranos observados, las alteraciones en la actividad de la mitocondria y la presencia de ROS y daño oxidativo se deben a una activación temprana de promotores de genes respiratorios mediada por la T3 y al reclutamiento específico de NRF1 y THRB.





**Figura 24. Análisis de los promotores de los genes *Tfam* y *Uqcrfs1* mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). a) Ilustración del promotor de *Tfam*. Se muestran las áreas amplificadas (I-IV) por las cuatro parejas de oligonucleótidos diseñados y el inicio de la transcripción del gen. b) Resultado del ensayo de ChIP con los diferentes anticuerpos utilizados y las diferentes áreas examinadas del promotor de *Tfam* de MEFs TP53KO (panel izquierdo) y MEFs ATMKO (panel derecho). c) Análisis por ChIP del promotor de *Uqcrfs1* de MEFs TP53KO y ATMKO. Los resultados mostrados corresponden a un experimento de ChIP representativo. Estos ensayos se repitieron dos veces.**

## Discusión





## 1.- El THRB induce senescencia en MEFs normales y deficientes en TP53.

Las THs y otros ligandos para los NRs regulan la proliferación celular, entre otros procesos fisiológicos. Aunque las THs son esenciales para el crecimiento de algunos tejidos y tipos celulares, en este trabajo mostramos que la respuesta de MEFs al tratamiento con T3 y a la sobreexpresión de THRB es la inhibición de la proliferación celular. De igual forma, el tratamiento hormonal de células de neuroblastoma, o fibroblastos que expresan THRB, conduce a una inhibición de la proliferación (218, 219, 228). Además de inhibir la proliferación de estos tipos celulares, los THRs son capaces de bloquear la transformación de fibroblastos NIH-3T3 por el oncogén RAS y de inhibir la formación de tumores por estas células en ratones desnudos (88, 89). Tanto la inhibición de la proliferación como las acciones del THR en la supresión tumoral dependen principalmente de la isoforma  $\text{THR}\beta 1$  (THRB) (9), que además retrasa la formación de tumores inducidos por células de carcinoma mamario y hepatocarcinoma en ratones y ejerce un potente efecto anti-metástasico (181, 182).

Otros ligandos para los NRs ejercen efectos similares en células en cultivo. El ácido retinoico es capaz de inhibir la proliferación celular robustamente. Además, en el caso de ciertas células de neuroblastoma, el tratamiento con el retinoide conduce a la acumulación de células con un fenotipo indistinguible del de las células senescentes (67, 307). Por otra parte, aunque el papel más comúnmente aceptado del receptor de andrógenos (AR) es promover la proliferación y supervivencia de las células del epitelio de la próstata y por lo tanto del cáncer de próstata, también se han documentado algunas acciones de este receptor como supresor tumoral (204) y muy recientemente en el estudio más completo realizado hasta la fecha, se ha podido demostrar que la activación continua del AR conduce a la inducción de senescencia celular de forma independiente de TP53 y a través de la generación de ROS (190).

La senescencia celular se considera como un primer mecanismo de defensa contra la transformación celular y la tumorigénesis. De hecho, el número de células senescentes es alto en las lesiones pre-cancerosas y disminuye drásticamente durante el curso de la progresión maligna (27, 47, 50, 52, 187), y se ha sugerido que la incapacidad de sufrir senescencia es una de las propiedades de las células madre tumorales que las hace resistentes a la terapia anti-tumoral (246). Con todos estos antecedentes nos planteamos estudiar el papel del THRB como un posible inductor de senescencia celular, lo que podría contribuir a sus efectos anti-tumorales.

Para ello, en primer lugar utilizamos cultivos primarios de MEFs procedentes de ratones normales, que después de un número finito de divisiones van acumulando células senescentes

hasta dejar de proliferar. El tratamiento de MEFs primarios con T3, a una concentración cercana a la fisiológica, dio lugar a una inhibición moderada de la proliferación celular que se pudo asociar a un aumento de los niveles de CDKN2A, uno de los principales marcadores de senescencia celular. Cuando se analizó el porcentaje de células positivas para la actividad SA- $\beta$ gal, se detectó que el número de células senescentes en cada pase fue más elevada tras el tratamiento con T3, indicando que la hormona induce una senescencia prematura de los cultivos. Ya que los niveles endógenos de THRB en MEFs podrían ser limitantes para una máxima inhibición de la proliferación e inducción de senescencia, también analizamos estos fenómenos en MEFs transfectados con un vector retroviral para este receptor. La sola expresión de THRB condujo a un fuerte bloqueo de la proliferación de los MEFs, que fue aún más marcada en presencia de ligando, y lo mismo ocurrió con la expresión de SA- $\beta$ gal, de forma que solamente después de tres pases tras la selección con el antibiótico, una parte importante de la población celular era senescente cuando las células que expresaban THRB eran incubadas con la hormona. Sorprendentemente, en este y otros ensayos, la expresión de THRB tuvo unos efectos notables en ausencia de ligando, indicando que o bien la depleción de T3 en el medio de cultivo no es completa, o bien que el receptor vacío cuando se expresa a altos niveles tiene efectos constitutivos. La reducción en la proliferación celular y la inducción de senescencia inducidas por el THRB son bastante significativas aunque no tan drásticas como la provocada por RAS<sup>Val12</sup>, un potente inductor de senescencia celular en MEFs (17, 65, 180, 261).

Una respuesta de daño al ADN juega un papel crucial en la inducción de senescencia celular (58, 64, 114, 202, 242, 243, 283, 306). De acuerdo con este hecho, la expresión de THRB y el tratamiento con T3 dan lugar a la formación de focos de daño al ADN que contienen un marcador de DSBs, como TP53BP1. El patrón de expresión y la morfología de estos focos fueron similares a los que se observan cuando los mismos cultivos se someten a radiación gamma o a estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No obstante, la magnitud del daño observado es moderada comparada con la de cultivos sometidos a estos estímulos o a estrés oncogénico por RAS<sup>Val12</sup>. En este último caso, encontramos una distribución de TP53BP1 *pan-nuclear* y unos niveles de expresión altos en la mayoría de las células, consistente con un daño replicativo severo (87, 107), aunque también pudimos observar un número reducido de células que presentaban innumerables focos de un tamaño similar al encontrado en las otras condiciones.

En el contexto de MEFs inmortalizados THRBKO pudimos corroborar que la isoforma que media la inhibición de la proliferación es THRB, en concordancia con los antecedentes mencionados más arriba y que además esta isoforma, pero no el THRA, induce senescencia celular. Para la inducción de senescencia celular se requiere la expresión de THRB transcripcionalmente funcional, ya que mutaciones que alteran su capacidad de unión al ADN,

o su interacción con correpresores o coactivadores disminuyen significativamente la inhibición proliferativa inducida en presencia de ligando y, paralelamente, la aparición de células senescentes. En este contexto celular de nuevo encontramos que la expresión de THRB induce la formación de focos de daño al ADN, y el patrón obtenido con los diferentes mutantes fue análogo al observado con la inhibición de la proliferación y la inducción de senescencia, lo que refuerza la idea de que la aparición de daño tiene un efecto causal sobre la senescencia mediada por el receptor.

Es de remarcar que el THRB sea capaz de inducir senescencia, aunque sea parcial, en estas células, que como se ha mencionado son inmortales y no sufren senescencia replicativa ni tampoco OIS, ya que la expresión de la forma oncogénica de Ras no solamente no produce un arresto proliferativo e induce senescencia, sino que aumenta la proliferación de forma significativa. De la misma forma, un shock con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que es un potente inductor de senescencia celular en fibroblastos normales (46), causó sólo un débil aumento de la senescencia celular en los fibroblastos THRBKO, que el THRB (pero no el THRA) fue capaz de incrementar de forma muy marcada, de forma que bajo estas condiciones oxidativas la mayor parte de la población de células que expresan el receptor se convierten en senescentes.

En función de estos resultados nos planteamos emplear sistemas de MEFs immortalizados para seguir estudiando estas nuevas acciones de THRB. Sin embargo, la ausencia del receptor endógeno en los THRBKO impedía evaluar los efectos del tratamiento hormonal sin la expresión exógena del receptor, lo que restaba transcendencia fisiológica a los resultados. Por ello, decidimos utilizar MEFs TP53KO primarios, también inmortales (108), y que expresan THRs endógenamente, y en los que observamos que la exposición continua a T3 y la expresión de THRB dan lugar a la inhibición proliferativa y a la inducción de senescencia celular de forma consistente y significativa, aunque el porcentaje de células senescentes era similar al obtenido en los THRBKO, que también carecen de TP53, y más bajo que el observado en fibroblastos normales. Estos resultados indican que, al contrario de lo que ocurre con la senescencia replicativa o la inducida por estrés en MEFs (11, 58, 62, 72, 311), el THR es capaz de sobrepasar, al menos parcialmente, el requerimiento de TP53.

## 2.- El THRB no induce senescencia en MEFs deficientes en ATM.

ATM es una quinasa imprescindible para la detección de daño genómico y para la señalización intracelular que conduce a su reparación (152, 153) y los MEFs deficientes en ATM son inmortales (35). Para analizar si ATM jugaba un papel en la senescencia inducida por el THRB, estudiamos su efecto en cultivos de MEFs procedentes de ratones ATMKO. De forma interesante, y al contrario de lo observado con los fibroblastos deficientes en TP53, la

incubación con T3 no indujo parada de la proliferación ni senescencia en ausencia de ATM, a pesar de que estos MEFs expresan niveles endógenos de THRB similares a los encontrados en los MEFs TP53KO. Más aún, tampoco la expresión exógena de THRB indujo arresto proliferativo ni senescencia. Esta falta de efecto la pudimos correlacionar de nuevo con el nivel de daño genómico. En efecto, al análisis cuantitativo de focos que contenían TP53BP1 y  $\gamma$ H2AX, indicó que los cultivos ATMKO mostraban un porcentaje bajo de células que contenían estos focos (alrededor del 12%), que no aumentó tras el tratamiento con T3 o la sobreexpresión de THRB.

ATM no sólo se requiere para la inhibición proliferativa y la aparición de senescencia y focos de daño al ADN inducidas por la T3 y THRB, sino que también fue imprescindible para la activación transcripcional mediada por la hormona en MEFs. Nuestros resultados sugieren, además, que ATM podría funcionar como un coactivador para THRB, ya que en experimentos de transfección transitoria con un plásmido reportador conteniendo un TRE es capaz de aumentar la transactivación dependiente de ligando. Futuros estudios deberán aclarar si como ocurre con otros coactivadores existe una interacción directa de THRB con ATM en respuesta a la unión de la hormona, o si existen otros mecanismos por los que la quinasa aumenta la actividad transcripcional del receptor.

### 3.- El THRB induce DSBs.

Los DSBs son fuertes inductores de senescencia celular (64, 214). Los resultados de este estudio sugieren que la inducción de DSBs y la activación de la respuesta celular a este daño son los probables desencadenantes de la aparición de células senescentes tras la exposición prolongada a T3 o la sobreexpresión de THRB. La presencia de focos que contienen  $\gamma$ H2AFX y TP53BP1 denota inequívocamente la presencia de roturas de ADN de doble cadena (DSBs).  $\gamma$ H2AFX es una variante de la histona 2A que se fosforila cuando se produce daño en el ADN y que tiene la función de marcar los sitios de las roturas, a los que se recluta (244). TP53BP1, en cambio, está implicada en la reparación de DSBs (216, 235). El tratamiento con T3 de MEFs TP53KO y la sobreexpresión de THRB indujeron un aumento significativo de la formación de focos que contenían estos dos marcadores de DSBs. La incorporación de dUTP-biotina dependiente de transferasa terminal (TdT) nos confirmó la existencia de roturas en el ADN en las células intactas inducidas por el tratamiento con la hormona y la expresión de THRB. Las roturas detectadas de esta forma se localizaban principalmente en áreas que podrían corresponder a heterocromatina (HC-ADN), tal y como se ha sugerido en otros estudios (322). Además, pudimos detectar en extractos celulares la activación de proteínas implicadas en la señalización del daño genómico como las proteínas CHEK o H2AFX, así como un aumento de los niveles de H3F3A K9 3me un marcador de

heterocromatinización característico de las células senescentes (264, 272, 328). Los efectos observados en la activación de estas proteínas fueron similares a los que se observaban cuando las células eran sometidas a un *shock* oxidativo mediante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

De la misma forma que la T3, el RA a bajas dosis, en la línea celular de cáncer mamario MCF-7 o en células de neuroblastoma humano conduce a senescencia celular (67). En estas últimas, el tratamiento con RA inhibe robustamente su proliferación y conduce bien a diferenciación o bien a senescencia, dependiendo de la expresión diferencial de CDKis (307). La exposición prolongada a RA durante siete días produce una expresión alta y sostenida de CDKN2C y a la aparición de células senescentes. En ese modelo no se analizó si el retinoide inducía una respuesta de daño al ADN, pero nosotros tenemos resultados preliminares en los que hemos observado que la incubación de MEFs con RA (concretamente con 9-*cis*-RA), conduce a la aparición de células senescentes y paralelamente a la formación de focos de daño al ADN que contienen  $\gamma$ H2AFX y TP53BP1 y representan por tanto DSBs. También la activación persistente del AR conduce a senescencia celular en células de cáncer de próstata (190). En este sistema, la aparición de senescencia celular es independiente de TP53, como en nuestro caso, pero sin embargo, no está asociado a la inducción de daño genómico. El tratamiento con andrógenos no aumentó el número focos que contienen  $\gamma$ H2AFX a diferencia de la hormona T3 o la sobreexpresión de THRB en MEFs.

#### 4.- La formación de DSBs es consecuencia de daño oxidativo secundario a la generación de ROS mitocondriales.

La formación de DSBs provocada por la T3 o THRB no permitía esclarecer su origen, aunque pudimos descartar que se debiera a daño replicativo. Como se ha comentado en la introducción, las roturas de cadena simple (SSBs) pueden convertirse espontáneamente en DSBs durante el estrés replicativo o también surgir como resultado de su reparación (113). *A priori*, los MEFs TP53KO, debido a la ausencia de TP53, serían más propensos al estrés replicativo. Sin embargo, el hecho de que la T3 o THRB no aumentaran la cantidad de células doblemente marcadas para  $\gamma$ H2AFX *pan-nuclear* y CCNA1 junto con el perfil de ADN de los cultivos que sobreexpresan THRB, que mostraba un aumento evidente en la fracción de células G0/G1, nos permitían descartar esta posibilidad. De la misma forma, los resultados nos permitieron descartar que la incidencia aumentada de DSBs fuera consecuencia de un defecto en la capacidad reparadora provocado por la hormona T3 y THRB. En la literatura no existen muchos datos sobre la influencia de los THRs en la reparación del ADN. Se ha descrito que, en ratones *Thra*<sup>-/-</sup>, se produce un retraso en la activación de TP53 en respuesta a irradiación en el intestino, donde THRA normalmente se expresa abundantemente (141). Nuestros resultados

muestran que la incidencia de DSBs no se debe a interferencia de la hormona T3 o THRB en la reparación de DSBs ya que la reducción en el número de células dañadas que fueron sometidas a radiación gamma, no fue significativamente diferente entre MEFs normales y TP53KO. En cualquier caso, de la misma forma que ocurría con los tratamientos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la hormona T3 y la sobreexpresión de THRB tienen efectos cooperativos con la radiación y afectan negativamente a la supervivencia celular post-radiación.

Resultados recientes sugieren que la activación transcripcional por los NRs y otros factores de transcripción se asocia a la aparición de daño genómico, en concreto DSBs. La acción de andrógenos a través del AR viene acompañada de la formación de translocaciones cromosómicas en tumores (157). En determinados puntos del genoma el AR es capaz de producir DSBs mediante la maquinaria enzimática que es capaz de reclutar (104). Otro ejemplo es el ER en células MCF-7, donde el daño genómico provocado tiene un papel en la iniciación y progresión de la neoplasia (196). Existe también una evidencia creciente de la asociación entre la maquinaria de reparación del ADN y la activación transcripcional dependiente de los NRs. Se ha sugerido que para la adecuada activación transcripcional es necesario el reclutamiento de algunos componentes de la maquinaria de reparación, como la actividad enzimática de la topoisomera II $\beta$  (TOPO2B) (131). Asimismo, la activación del ER por ligando conduce al reclutamiento del complejo TOPO2B/PKKDC/XRCC5/XRCC6 en el promotor del gen *pS2*, que rompe el ADN para cambiar su estructura y facilitar el proceso transcripcional y también la activación del AR promueve al reclutamiento de tales complejos y a la aparición de DSBs (103).

En nuestro caso, las DSBs inducidas por la T3 y el THRB tienen un origen oxidativo ya que i) estos tratamientos aumentan de forma significativa la aparición de la base oxidada 8-OH-dG, utilizada como biomarcador de daño oxidativo en el ADN; ii) existe una cofocalización significativa de 8-OH-dG y TP53BP1 y iii) su número se ve reducido drásticamente tras el tratamiento con el antioxidante NAC. Los resultados además nos indicaron que la mayoría del daño genómico observado en MEFs tiene el mismo origen, ya que el tratamiento con NAC también redujo significativamente el número de focos que contenían TP53BP1 y  $\gamma$ H2AFX en las condiciones basales. La aparición de daño genómico oxidativo es compatible con los resultados en los que demostramos que la hormona y la expresión de THRB aumentaron los niveles celulares de GSSG, la forma oxidada de la glutatión. A su vez, esta oxidación parece ser consecuencia del aumento de los niveles de ROS que observamos en estas condiciones. La mitocondria es la fuente principal de ROS (26, 41, 169, 274, 276) y el aumento de ROS parece ser además de origen mitocondrial, ya que tanto la T3 como la expresión de THRB aumentaron significativamente la generación de estos radicales en la mitocondria. La inducción de daño oxidativo consecuencia de la generación de ROS se corroboró con el hallazgo de un

aumento en la expresión de genes que codifican enzimas detoxificantes encargadas de eliminar las ROS de la célula.

Las ROS pueden inducir, entre otras lesiones, la oxidación de bases, sitios abásicos o incluso roturas de ADN si el enlace deoxi-ribosa-fosfato es atacado. Si dos ataques de las ROS tienen lugar en sitios cercanos, se pueden producir DSBs. La conversión de lesiones oxidativas leves a SSBs también pueden conducir espontáneamente a la formación de DSBs. De la misma forma, después del procesamiento enzimático de la base dañada durante su reparación se pueden producir DSBs o cuando la maquinaria de transcripción se encuentra con la maquinaria de reparación de SSBs (34, 55, 59, 162, 194, 331). Las lesiones producidas por ROS se reparan principalmente por el sistema de escisión de bases (BER), que implica la rotura del enlace N-glicosídico que une la base al esqueleto desoxi-ribosa-fosfato, catalizado por ADN glicosilasas. Posteriormente, el sitio AP (apurínico ó apirimidínico) es roto por una AP endonucleasa que cataliza la incisión del enlace fosfodiéster en posición 5' al sitio AP. La escisión del azúcar se completa con la eliminación del residuo desoxi-ribosa-fosfato por la acción de una desoxi-ribosa-fosfodiesterasa que corta el otro enlace fosfodiéster. Finalmente, una ADN polimerasa y una ligasa se encargan de rellenar el hueco y unir dos extremos del ADN. Sin embargo, si la lesión implica DSBs, la célula utiliza el sistema de NHEJ, que opera principalmente en G1/S antes de que la célula haya replicado el ADN, el MMEJ que opera durante la fase S y la recombinación homóloga que teóricamente actuaría en S/G2, cuando ya hay dos cromátidas hermanas disponibles (61, 185, 325). Por lo tanto, bien de forma directa o asociado a su reparación, las ROS pueden producir roturas en el ADN.

## 5.- La T3 y el THRB aumentan la expresión de genes mitocondriales y el consumo de oxígeno en MEFs.

Las THs aumentan el consumo de oxígeno mitocondrial y pueden, consecuentemente, producir ROS (301, 302). En ratas hipotiroideas el consumo de oxígeno aumenta entre las 24 y 48 horas después del tratamiento con T3 (287, 288), concomitantemente con aumentos en los niveles de expresión de genes responsables de la biogénesis mitocondrial, como los genes respiratorios. El incremento en la cantidad de mitocondrias se correlacionaría con el aumento de la respiración mitocondrial a esos tiempos (225). Antes, dentro de las seis primeras horas de tratamiento algunos coactivadores como PPARGC1A aumentan su expresión, lo que se ha relacionado con esos cambios de expresión tardía.

Nuestros resultados muestran también cambios de expresión significativos en genes importantes para la función mitocondrial tras el tratamiento con T3, a tiempos aún más cortos que los analizados previamente *in vivo*. Entre ellos se encuentran aumentos en los transcritos



de diferentes genes de la cadena respiratoria, incluyendo tanto genes codificados en el núcleo como en la mitocondria, así como de *Tfam*, un factor de transcripción que juega un papel crucial en la transcripción de genes mitocondriales. Sin embargo, estos cambios tempranos no se pudieron asociar a un aumento en PPARGC1A, ya que su ARNm sólo aumentó significativamente más tardíamente. Esto parece indicar que los niveles del coactivador no son limitantes para la expresión temprana de los genes mitocondriales inducidas por T3 o THRΒ, aunque su inducción si podría ser requerida en etapas más tardías. Por otra parte, no podemos descartar que sin existir cambios en los niveles de ARNm del coactivador, sus niveles de proteína o su activación (p.ej. por fosforilación) no se incrementen rápidamente en respuesta a la hormona.

Tampoco los niveles de ARNm de NRF1, otro factor de transcripción esencial en la transcripción y biogénesis mitocondrial respondieron a T3, aunque en otros sistemas celulares se ha descrito que se inducen robustamente dentro de un período de seis horas (25,28). Sin embargo, sí observamos cambios tempranos en los niveles de proteína NRF1 en respuesta a la T3 y niveles más altos en las células que expresan el receptor. Ya que su ARNm no variaba, el aumento en la expresión de NRF1 mediado por la T3 señala la existencia de un mecanismo post-transcripcional, probablemente debido a la estabilización de la proteína a través de modificaciones postraduccionales. Por otra parte, en hepatocitos de rata se ha descrito que el NRF1 es mayoritariamente citoplásmico y que se activa y se transporta al núcleo en respuesta a estímulos como la activación de la PIK3CA (48). Sin embargo, en nuestro sistema no observamos cambios en la localización subcelular de NRF1 después del tratamiento con T3, ya que su expresión en MEFs es ya mayoritariamente nuclear en todas las condiciones experimentales examinadas.

El NRF1 es una fosfoproteína, cuya fosforilación aumenta su capacidad de unión al ADN (20). Existen varias quinasas candidatas a fosforilar NRF1 *in vivo* y entre ella se encuentra la PRKAA, ya que su activación crónica produce activación de NRF1, aumento de la unión a su sitio de reconocimiento en el ADN y biogénesis mitocondrial (20). Esta quinasa es además un regulador clave de la biogénesis mitocondrial, ya que aparte de la posible activación directa de NRF1, también activa directamente a PPARGC1A (75). Por otra parte, también se ha descrito una activación temprana de PKRAA por la T3 en el hipotálamo (332). Por ello, examinamos si la T3 o el THRΒ eran capaces de activar la PKRAA en MEFs y observamos que, en efecto, sus niveles de fosforilación aumentaban de forma rápida tras el tratamiento con la hormona. Que esta activación es importante en la aparición de daño genómico en respuesta a T3 y THRΒ se demostró con el uso del *Compound C*, un inhibidor específico de esta quinasa, ya que la formación de focos de daño al ADN se redujo de forma drástica en las células en las que se inhibió la actividad de la PKAA.

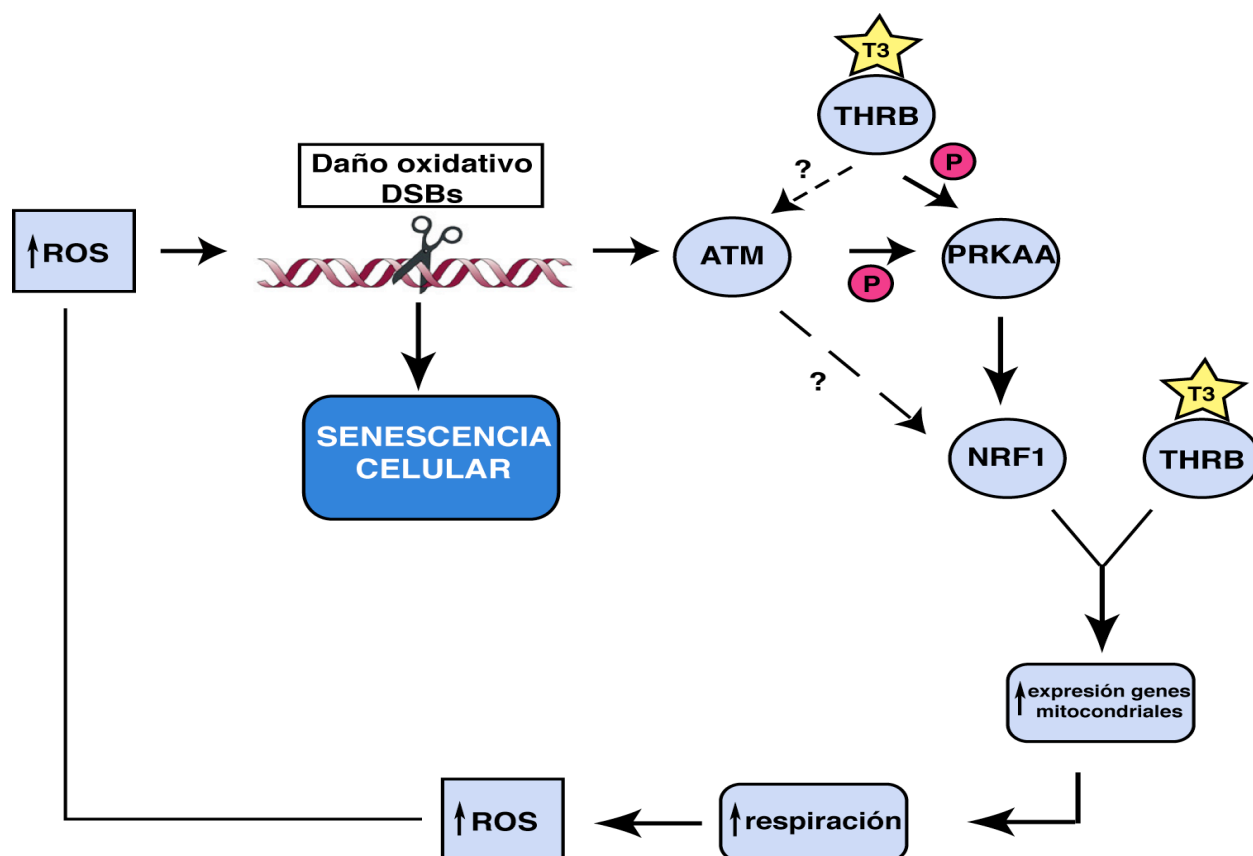
El mecanismo de activación de la actividad mitocondrial por la T3 y THRB que opera en MEFs, según nuestros resultados, es un mecanismo rápido de estimulación transcripcional que se acompaña de la remodelación de la cromatina detectada por el aumento de la acetilación de histonas y del reclutamiento de NRF1 y el THRB al promotor proximal de genes importantes para la función mitocondrial como *Tfam* o *Uqcfrs1*. El aumento del reclutamiento de NRF1 a los promotores podría ser un reflejo únicamente de los mayores niveles del factor observados tras el tratamiento con T3, pero también podría reflejar una mayor fosforilación, que podría ser mediada por la activación de la PKRAA, o incluso ser consecuencia de una interacción directa con el THRB, o con el complejo transcripcional que se ensambla en el promotor, que lo atraería a su sitio de unión. Los experimentos realizados tampoco permiten descartar la posibilidad de que sea la unión de THRB al promotor el evento primario, y que el cambio en la estructura de la cromatina permita la unión de NRF1 y la activación transcripcional de los genes mitocondriales.

La activación rápida de los promotores de los genes mitocondriales, algunos asociados a la respiración, conduciría a cambios en la actividad mitocondrial. Esto lo hemos comprobado experimentalmente en estudios de la actividad mitocondrial en células intactas como refleja el aumento en el consumo de O<sub>2</sub> en los diferentes estados respiratorios, ya a tiempos cortos de incubación con T3 o con la expresión de THRB. Estos parámetros son indicativos de un aumento en la respiración mitocondrial y del acoplamiento mitocondrial, reflejando un súbito incremento en la actividad mitocondrial que recuerda a la que ocurre durante la biogénesis mitocondrial. Estos cambios tempranos en la actividad mitocondrial conducirían a un incremento de la ROS mitocondriales, tal y como se ha descrito que ocurre a tiempos más tardíos (24-48 horas) tras el tratamiento de ratas hipotiroideas durante la biogénesis mitocondrial (225).

El mecanismo de acción de la T3 y el THRB para la activación de la función mitocondrial en MEFs implica también la participación de ATM. Se ha descrito que ATM es capaz de promover la biogénesis mitocondrial mediante su acción directa sobre la subunidad  $\alpha$  de la PRKAA, a la que fosforila (5, 280, 281). Nuestros datos indican que ATM también participa en la inducción de la fosforilación de PRKAA por T3, ya que la activación de esta quinasa por la hormona se encuentra significativamente disminuida en los MEFs ATMKO. También se ha descrito que para la activación transcripcional por los receptores nucleares y otros factores de transcripción, ATM puede reclutarse a la cromatina junto a otros componentes de la maquinaria de reparación del ADN, como XCC6, XRCC5, PARP1, o TOPO2B (103, 104, 131, 157, 176, 184, 195, 220, 321). Nuestros experimentos de ChIP no han permitido demostrar este último mecanismo, ya que no pudimos detectar la presencia de ATM en cromatina en ninguna condición experimental, al menos al tiempo de estimulación analizado. Sin embargo, si hemos observado que ATM es necesaria tanto para el reclutamiento de NRF1 a los promotores

mitocondriales, como para la inducción de la transcripción de los genes de la cadena respiratoria, factores de transcripción y coactivadores como PPARGC1A. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la ruta de activación de PRKAA dependiente de ATM es la que está mediando principalmente los cambios observados en los genes mitocondriales y la actividad mitocondrial. Tampoco podemos descartar una interacción entre THRB y ATM que apoye una función de ATM como corregulador de los THRs.

En la **Fig. 1**, mostramos una ilustración que recoge la hipótesis de trabajo que se desprende de los resultados.



**Figura 1. Ilustración de las hipótesis que proponemos en este trabajo.** Un elemento clave en la regulación de la biogénesis mitocondrial es PRKAA. La activación de PRKAA conduce a la activación de varios factores clave en este proceso como NRF1 y la consecuente activación de los genes mitocondriales. En este trabajo proponemos que en MEFs tiene lugar una activación rápida de este proceso en respuesta a la unión de la T3 al THRB, a través de la fosforilación de PRKAA, que da lugar a la activación y reclutamiento de al menos NRF1 a promotores de genes mitocondriales importantes, entre ellos *Tfam*, un factor de transcripción crucial para la expresión génica en este orgánulo. La ruta de activación mitocondrial por la T3 requiere ATM, ya que, en ausencia de ésta la activación de PRKAA es muy débil, no hay reclutamiento de NRF1 a los promotores mitocondriales, ni aumento de la transcripción de genes mitocondriales por la hormona y el receptor. Los cambios en la actividad mitocondrial conducen a la producción de ROS, que causaría roturas de doble cadena en el ADN y conduciría a la senescencia celular. Las ROS y el daño genómico a su vez, pueden activar ATM. En este trabajo no descartamos la posible interacción de THRB con ATM ni la activación directa de NRF1 por ATM.

## 6.- El hipertiroidismo causa daño al ADN en tejidos de ratón *in vivo*.

El daño oxidativo causado por las ROS durante el metabolismo normal de la célula, puede contribuir a la inestabilidad cromosómica, carcinogénesis e incluso a senescencia celular como hemos mostrado en este estudio. Nuestros resultados sugieren que el proceso de inducción de estrés oxidativo, daño genómico y eventualmente senescencia celular son los responsables en parte, de las nuevas acciones del THRB como supresor tumoral.

Por otra parte, en la literatura se ha documentado la aparición de daño oxidativo en proteínas, lípidos y ADN en distintos órganos de animales hipertiroides (147, 212, 285). Los órganos diana que presentan este daño muestran una actividad metabólica elevada y altos niveles de expresión de los THR (147, 212, 285). Por otra parte, en pacientes hipotiroides se ha observado que el tratamiento con hormonas tiroideas induce estrés oxidativo en hígado, corazón y músculo esquelético (73, 301) como consecuencia del incremento del metabolismo oxidativo asociado a la actividad COX (299) y a cambios en la expresión de NRF1 y 2 y PPARGC1A (300).

Una de las características clínicas del hipertiroidismo es el daño tisular hepático (178) y data del 1874 (102). Se sabe que esto ocurre en más de la mitad de los pacientes hipertiroides. Este daño se caracteriza por presentar hígado graso, vacuolización citoplasmática, irregularidad nuclear e hiper cromatismo en hepatocitos (295). Además, se producen cambios funcionales y estructurales en las mitocondrias. Éstas incrementan su masa y también forman megamitocondrias en estos pacientes, lo que también se ha observado en animales de experimentación (132, 138).

Los datos presentados en este trabajo sugieren que este daño hepático tan extenso asociado al hipertiroidismo podría estar relacionado con el estrés oxidativo inducido por la unión de la hormona al THRB. Por primera vez demostramos la formación de focos de  $\gamma$ H2AFX en ratones hipertiroides, eligiendo como órganos a estudiar el hígado y el riñón, que son dos importantes tejidos diana de estas hormonas y que expresan THRB (147, 215). Los datos obtenidos demostraron que los THR endógenos son capaces de mediar un efecto importante sobre el daño al ADN en esta condición, sugiriendo que esta respuesta podría participar en las alteraciones patológicas observadas en el hipertiroidismo. También *in vivo* pudimos comprobar que las THs generan daño oxidativo del ADN, ya que inducen la aparición de la base oxidada 8-OH-dG. Estos resultados indican la posible importancia fisiopatológica de la función del THRB como inductor de estrés oxidativo y daño al ADN. Sin embargo, en estos tejidos no pudimos detectar la presencia de células senescentes expresando actividad SA- $\beta$ gal. Aunque

no podemos descartar que deficiencias técnicas no hayan permitido esta detección, es posible que en los animales jóvenes utilizados en este estudio las THs no sean capaces de inducir una senescencia prematura, que quizás pudiera observarse durante el envejecimiento, lo que nos anima a la realización de futuros estudios en edades superiores.

## Conclusiones



## CONCLUSIONES

1. El tratamiento prolongado con la hormona T3 y/o la sobreexpresión del THRB, pero no de THRA, inducen el fenómeno de senescencia celular en MEFs de forma independiente de la expresión del gen supresor de tumores TP53, pero dependiente de ATM.
2. La inducción de senescencia es concomitante con la aparición de focos de daño en el ADN, indicativa de roturas de doble cadena, que no es debida a la inhibición de la capacidad reparadora del daño genómico de la célula.
3. El daño genómico es secundario a la generación de especies reactivas de oxígeno, de origen mitocondrial, que producen daño oxidativo en el ADN.
4. La unión de la T3 al THRB causa un incremento temprano en la expresión de genes de la cadena respiratoria y un aumento del consumo de oxígeno en células intactas, que sería el origen de las especies reactivas de oxígeno.
5. La rápida activación transcripcional por T3 de los genes reguladores de la función mitocondrial se relaciona con la remodelación de la cromatina y con el reclutamiento receptor y del factor de transcripción NRF1 a sus promotores.
6. El tratamiento con hormona T3 y/o la sobreexpresión del THRB conducen a un aumento postranscripcional de los niveles del factor de transcripción NRF1, probablemente mediado por la activación de la quinasa AMPK.
7. La actividad AMPK parece también necesaria para la inducción de daño al ADN por la hormona y el THRB.
8. La regulación de la actividad mitocondrial mediada por la hormona, la generación de ROS y la aparición de daño genómico en MEFs, requiere la expresión de ATM.
9. ATM parece ser necesaria, al menos, para la estabilización de NRF1 y su reclutamiento a los genes mitocondriales en respuesta a T3, aunque también podría actuar como coactivador transcripcional para THRB.
10. El hipertiroidismo conduce a la aparición de daño genómico de origen oxidativo *in vivo*, en órganos como el hígado y el riñón.

En resumen, los resultados de esta Tesis muestran que la hormona T3 y el receptor THRB inducen la aparición de daño en el ADN, de origen oxidativo, producto de una alteración de la actividad mitocondrial. Probablemente, la persistencia del daño infligido en el ADN, conduce a la aparición de células senescentes, incluso en la ausencia de TP53. Estas nuevas actividades del THRB podrían explicar, en parte, su función como gen supresor de tumores y abrirían la posibilidad de crear terapias antitumorales basadas en estos receptores nucleares. Además, los resultados sugieren que el daño tisular hepático asociado a la condición hipertiroidica podría estar relacionado con el estrés oxidativo y daño al ADN.





## **Bibliografía**



1. **Abraham, R. T.** 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**:2177-2196.
2. **Acosta, J. C., A. O'Loughlen, A. Banito, M. V. Guijarro, A. Augert, S. Raguz, M. Fumagalli, M. Da Costa, C. Brown, N. Popov, Y. Takatsu, J. Melamed, F. d'Adda di Fagagna, D. Bernard, E. Hernando, and J. Gil.** 2008. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**:1006-1018.
3. **Ahn, J., M. Urist, and C. Prives.** 2004. The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)* **3**:1039-1047.
4. **Alcorta, D. A., Y. Xiong, D. Phelps, G. Hannon, D. Beach, and J. C. Barrett.** 1996. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:13742-13747.
5. **Alexander, A., S. L. Cai, J. Kim, A. Nanez, M. Sahin, K. H. MacLean, K. Inoki, K. L. Guan, J. Shen, M. D. Person, D. Kusewitt, G. B. Mills, M. B. Kastan, and C. L. Walker.** 2010. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:4153-4158.
6. **Ali, I. U., R. Lidereau, and R. Callahan.** 1989. Presence of two members of c-erbA receptor gene family (c-erbA beta and c-erbA2) in smallest region of somatic homozygosity on chromosome 3p21-p25 in human breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **81**:1815-1820.
7. **Alvarez-Dolado, M., M. Gonzalez-Moreno, A. Valencia, M. Zenke, J. Bernal, and A. Munoz.** 1999. Identification of a mammalian homologue of the fungal Tom70 mitochondrial precursor protein import receptor as a thyroid hormone-regulated gene in specific brain regions. *J Neurochem* **73**:2240-2249.
8. **Andegeko, Y., L. Moyal, L. Mittelman, I. Tsarfaty, Y. Shiloh, and G. Rotman.** 2001. Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *J Biol Chem* **276**:38224-38230.
9. **Aranda, A., O. Martinez-Iglesias, L. Ruiz-Llorente, V. Garcia-Carpizo, and A. Zambrano.** 2009. Thyroid receptor: roles in cancer. *Trends Endocrinol Metab* **20**:318-324.
10. **Aranda, A., and A. Pascual.** 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* **81**:1269-1304.
11. **Artandi, S. E., S. Chang, S. L. Lee, S. Alson, G. J. Gottlieb, L. Chin, and R. A. DePinho.** 2000. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* **406**:641-645.
12. **Attia, R. R., S. Connaughton, L. R. Boone, F. Wang, M. B. Elam, G. C. Ness, G. A. Cook, and E. A. Park.** 2010. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) by thyroid hormone: role of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator (PGC-1 alpha). *J Biol Chem* **285**:2375-2385.
13. **Baniahmad, A., X. Leng, T. P. Burris, S. Y. Tsai, M. J. Tsai, and B. W. O'Malley.** 1995. The tau 4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required for release of a putative corepressor(s) necessary for transcriptional silencing. *Mol Cell Biol* **15**:76-86.
14. **Barlow, C., B. Meister, M. Lardelli, U. Lendahl, and B. Vennstrom.** 1994. Thyroid abnormalities and hepatocellular carcinoma in mice transgenic for v-erbA. *EMBO J* **13**:4241-4250.
15. **Barrera-Hernandez, G., Q. Zhan, R. Wong, and S. Y. Cheng.** 1998. Thyroid hormone receptor is a negative regulator in p53-mediated signaling pathways. *DNA Cell Biol* **17**:743-750.

16. **Bartkova, J., Z. Horejsi, K. Koed, A. Kramer, F. Tort, K. Zieger, P. Guldberg, M. Sehested, J. M. Nesland, C. Lukas, T. Orntoft, J. Lukas, and J. Bartek.** 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**:864-870.
17. **Bartkova, J., N. Rezaei, M. Lontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva, L. V. Vassiliou, E. Kolettas, K. Niforou, V. C. Zoumpourlis, M. Takaoka, H. Nakagawa, F. Tort, K. Fugger, F. Johansson, M. Sehested, C. L. Andersen, L. Dyrskjot, T. Orntoft, J. Lukas, C. Kittas, T. Helleday, T. D. Halazonetis, J. Bartek, and V. G. Gorgoulis.** 2006. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**:633-637.
18. **Beato, M., P. Herrlich, and G. Schutz.** 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**:851-857.
19. **Belandia, B., M. J. Latasa, A. Villa, and A. Pascual.** 1998. Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of the beta-amyloid precursor protein gene. *J Biol Chem* **273**:30366-30371.
20. **Bergeron, R., J. M. Ren, K. S. Cadman, I. K. Moore, P. Perret, M. Pypaert, L. H. Young, C. F. Semenkovich, and G. I. Shulman.** 2001. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**:E1340-1346.
21. **Bergh, J. J., H. Y. Lin, L. Lansing, S. N. Mohamed, F. B. Davis, S. Mousa, and P. J. Davis.** 2005. Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* **146**:2864-2871.
22. **Bhat, M. K., C. Yu, N. Yap, Q. Zhan, Y. Hayashi, P. Seth, and S. Cheng.** 1997. Tumor suppressor p53 is a negative regulator in thyroid hormone receptor signaling pathways. *J Biol Chem* **272**:28989-28993.
23. **Bigler, J., and R. N. Eisenman.** 1995. Novel location and function of a thyroid hormone response element. *EMBO J* **14**:5710-5723.
24. **Blasco, M. A., H. W. Lee, M. P. Hande, E. Samper, P. M. Lansdorp, R. A. DePinho, and C. W. Greider.** 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**:25-34.
25. **Bodenner, D. L., M. A. Mroczynski, B. D. Weintraub, S. Radovick, and F. E. Wondisford.** 1991. A detailed functional and structural analysis of a major thyroid hormone inhibitory element in the human thyrotropin beta-subunit gene. *J Biol Chem* **266**:21666-21673.
26. **Boveris, A., N. Oshino, and B. Chance.** 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* **128**:617-630.
27. **Braig, M., S. Lee, C. Loddenkemper, C. Rudolph, A. H. Peters, B. Schlegelberger, H. Stein, B. Dorken, T. Jenuwein, and C. A. Schmitt.** 2005. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**:660-665.
28. **Brand, M. D., and M. P. Murphy.** 1987. Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. *Biol Rev Camb Philos Soc* **62**:141-193.
29. **Brenner, A. J., M. R. Stampfer, and C. M. Aldaz.** 1998. Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene* **17**:199-205.
30. **Bronnegard, M., O. Topping, J. Boos, C. Sylven, C. Marcus, and G. Wallin.** 1994. Expression of thyrotropin receptor and thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* **79**:384-389.

31. **Brown, J. P., W. Wei, and J. M. Sedivy.** 1997. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* **277**:831-834.
32. **Cadenas, E.** 2004. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med* **25**:17-26.
33. **Cadenas, E., A. Boveris, C. I. Ragan, and A. O. Stoppani.** 1977. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **180**:248-257.
34. **Cadet, J., T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J. P. Pouget, J. L. Ravanat, and S. Sauvaigo.** 1999. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* **424**:9-21.
35. **Callen, E., M. Jankovic, N. Wong, S. Zha, H. T. Chen, S. Difilippantonio, M. Di Virgilio, G. Heidkamp, F. W. Alt, A. Nussenzweig, and M. Nussenzweig.** 2009. Essential role for DNA-PKcs in DNA double-strand break repair and apoptosis in ATM-deficient lymphocytes. *Mol Cell* **34**:285-297.
36. **Campisi, J., and F. d'Adda di Fagagna.** 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:729-740.
37. **Cao, X., F. Kambe, L. C. Moeller, S. Refetoff, and H. Seo.** 2005. Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol Endocrinol* **19**:102-112.
38. **Casanova, J., E. Helmer, S. Selmi-Ruby, J. S. Qi, M. Au-Fliegner, V. Desai-Yajnik, N. Koudinova, F. Yarm, B. M. Raaka, and H. H. Samuels.** 1994. Functional evidence for ligand-dependent dissociation of thyroid hormone and retinoic acid receptors from an inhibitory cellular factor. *Mol Cell Biol* **14**:5756-5765.
39. **Casas, F., P. Rochard, A. Rodier, I. Cassar-Malek, S. Marchal-Victorion, R. J. Wiesner, G. Cabello, and C. Wrutniak.** 1999. A variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbAalpha1 plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis. *Mol Cell Biol* **19**:7913-7924.
40. **Chakravarti, D., V. J. LaMorte, M. C. Nelson, T. Nakajima, I. G. Schulman, H. Juguilon, M. Montminy, and R. M. Evans.** 1996. Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* **383**:99-103.
41. **Chance, B., H. Sies, and A. Boveris.** 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**:527-605.
42. **Chanoux, R. A., B. Yin, K. A. Urtishak, A. Asare, C. H. Bassing, and E. J. Brown.** 2009. ATR and H2AX cooperate in maintaining genome stability under replication stress. *J Biol Chem* **284**:5994-6003.
43. **Chattopadhyay, S., D. K. Sahoo, U. Subudhi, and G. B. Chainy.** 2007. Differential expression profiles of antioxidant enzymes and glutathione redox status in hyperthyroid rats: a temporal analysis. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **146**:383-391.
44. **Chen, H. W., and M. L. Privalsky.** 1993. The erbA oncogene represses the actions of both retinoid X and retinoid A receptors but does so by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* **13**:5970-5980.
45. **Chen, J. D., and R. M. Evans.** 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**:454-457.
46. **Chen, Q. M., J. C. Bartholomew, J. Campisi, M. Acosta, J. D. Reagan, and B. N. Ames.** 1998. Molecular analysis of H2O2-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J* **332 ( Pt 1)**:43-50.

47. **Chen, Z., L. C. Trotman, D. Shaffer, H. K. Lin, Z. A. Dotan, M. Niki, J. A. Koutcher, H. I. Scher, T. Ludwig, W. Gerald, C. Cordon-Cardo, and P. P. Pandolfi.** 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**:725-730.
48. **Chin, L., S. E. Artandi, Q. Shen, A. Tam, S. L. Lee, G. J. Gottlieb, C. W. Greider, and R. A. DePinho.** 1999. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* **97**:527-538.
49. **Clayton, D. A.** 1992. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int Rev Cytol* **141**:217-232.
50. **Collado, M., J. Gil, A. Efeyan, C. Guerra, A. J. Schuhmacher, M. Barradas, A. Benguria, A. Zaballos, J. M. Flores, M. Barbacid, D. Beach, and M. Serrano.** 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* **436**:642.
51. **Collado, M., and M. Serrano.** 2006. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* **6**:472-476.
52. **Collado, M., and M. Serrano.** 2010. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* **10**:51-57.
53. **Columbano, A., M. Simbula, M. Pibiri, A. Perra, M. Deidda, J. Locker, A. Pisanu, A. Uccheddu, and G. M. Ledda-Columbano.** 2008. Triiodothyronine stimulates hepatocyte proliferation in two models of impaired liver regeneration. *Cell Prolif* **41**:521-531.
54. **Cook, C. B., I. Kakucska, R. M. Lechan, and R. J. Koenig.** 1992. Expression of thyroid hormone receptor beta 2 in rat hypothalamus. *Endocrinology* **130**:1077-1079.
55. **Cooke, M. S., M. D. Evans, M. Dizdaroglu, and J. Lunec.** 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* **17**:1195-1214.
56. **Coppe, J. P., C. K. Patil, F. Rodier, A. Krtolica, C. M. Beausejour, S. Parrinello, J. G. Hodgson, K. Chin, P. Y. Desprez, and J. Campisi.** 2010. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One* **5**:e9188.
57. **Coppe, J. P., C. K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D. P. Munoz, J. Goldstein, P. S. Nelson, P. Y. Desprez, and J. Campisi.** 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* **6**:2853-2868.
58. **d'Adda di Fagagna, F., P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N. P. Carter, and S. P. Jackson.** 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**:194-198.
59. **De Zio D, B. M., Cecconi F.** 2012. Oxidative DNA Damage in Neurons: Implication of Ku in Neuronal Homeostasis and Survival. *International Journal of Cell Biology* **2012**.
60. **Debacq-Chainiaux, F., J. D. Erusalimsky, J. Campisi, and O. Toussaint.** 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* **4**:1798-1806.
61. **Decottignies, A.** 2007. Microhomology-mediated end joining in fission yeast is repressed by pku70 and relies on genes involved in homologous recombination. *Genetics* **176**:1403-1415.
62. **Deng, Y., S. S. Chan, and S. Chang.** 2008. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer* **8**:450-458.

63. **Desbois, C., D. Aubert, C. Legrand, B. Pain, and J. Samarut.** 1991. A novel mechanism of action for v-ErbA: abrogation of the inactivation of transcription factor AP-1 by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Cell* **67**:731-740.
64. **Di Leonardo, A., S. P. Linke, K. Clarkin, and G. M. Wahl.** 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* **8**:2540-2551.
65. **Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P. G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P. G. Pelicci, and F. d'Adda di Fagagna.** 2006. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**:638-642.
66. **Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, and et al.** 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:9363-9367.
67. **Dokmanovic, M., B. D. Chang, J. Fang, and I. B. Roninson.** 2002. Retinoid-induced growth arrest of breast carcinoma cells involves co-activation of multiple growth-inhibitory genes. *Cancer Biol Ther* **1**:24-27.
68. **Dong, H., C. L. Yauk, A. Rowan-Carroll, S. H. You, R. T. Zoeller, I. Lambert, and M. G. Wade.** 2009. Identification of thyroid hormone receptor binding sites and target genes using ChIP-on-chip in developing mouse cerebellum. *PLoS One* **4**:e4610.
69. **DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller, and M. P. Calos.** 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* **7**:379-387.
70. **Evans, M. J., and R. C. Scarpulla.** 1989. Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem* **264**:14361-14368.
71. **Evans, M. J., and R. C. Scarpulla.** 1990. NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev* **4**:1023-1034.
72. **Ferbeyre, G., E. de Stanchina, E. Querido, N. Baptiste, C. Prives, and S. W. Lowe.** 2000. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* **14**:2015-2027.
73. **Fernandez, V., G. Tapia, P. Varela, P. Romanque, D. Cartier-Ugarte, and L. A. Videla.** 2006. Thyroid hormone-induced oxidative stress in rodents and humans: a comparative view and relation to redox regulation of gene expression. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **142**:231-239.
74. **Fernandez-Capetillo, O., H. T. Chen, A. Celeste, I. Ward, P. J. Romanienko, J. C. Morales, K. Naka, Z. Xia, R. D. Camerini-Otero, N. Motoyama, P. B. Carpenter, W. M. Bonner, J. Chen, and A. Nussenzweig.** 2002. DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol* **4**:993-997.
75. **Fernandez-Marcos, P. J., and J. Auwerx.** 2011. Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr* **93**:884S-890.
76. **Finkel, T.** 2003. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* **15**:247-254.
77. **Finkel, T., and N. J. Holbrook.** 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**:239-247.
78. **Flamant, F., J. D. Baxter, D. Forrest, S. Refetoff, H. Samuels, T. S. Scanlan, B. Vennstrom, and J. Samarut.** 2006. International Union of Pharmacology. LIX. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: thyroid hormone receptors. *Pharmacol Rev* **58**:705-711.



79. **Fondell, J. D., H. Ge, and R. G. Roeder.** 1996. Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:8329-8333.
80. **Forman, B. M., and H. H. Samuels.** 1990. Dimerization among nuclear hormone receptors. *New Biol* **2**:587-594.
81. **Forrest, D., G. Golarai, J. Connor, and T. Curran.** 1996. Genetic analysis of thyroid hormone receptors in development and disease. *Recent Prog Horm Res* **51**:1-22.
82. **Forrest, D., and B. Vennstrom.** 2000. Functions of thyroid hormone receptors in mice. *Thyroid* **10**:41-52.
83. **Fraichard, A., O. Chassande, M. Plateroti, J. P. Roux, J. Trouillas, C. Dehay, C. Legrand, K. Gauthier, M. Kedinger, L. Malaval, B. Rousset, and J. Samarut.** 1997. The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *EMBO J* **16**:4412-4420.
84. **Fu, X., S. Wan, Y. L. Lyu, L. F. Liu, and H. Qi.** 2008. Etoposide induces ATM-dependent mitochondrial biogenesis through AMPK activation. *PLoS One* **3**:e2009.
85. **Futreal, P. A., C. Cochran, J. R. Marks, J. D. Iglehart, W. Zimmerman, J. C. Barrett, and R. W. Wiseman.** 1994. Mutation analysis of the THRA1 gene in breast cancer: deletion/fusion of the gene to a novel sequence on 17q in the BT474 cell line. *Cancer Res* **54**:1791-1794.
86. **Futreal, P. A., P. Soderkvist, J. R. Marks, J. D. Iglehart, C. Cochran, J. C. Barrett, and R. W. Wiseman.** 1992. Detection of frequent allelic loss on proximal chromosome 17q in sporadic breast carcinoma using microsatellite length polymorphisms. *Cancer Res* **52**:2624-2627.
87. **Gagou, M. E., P. Zuazua-Villar, and M. Meuth.** 2010. Enhanced H2AX phosphorylation, DNA replication fork arrest, and cell death in the absence of Chk1. *Mol Biol Cell* **21**:739-752.
88. **Garcia-Silva, S., and A. Aranda.** 2004. The thyroid hormone receptor is a suppressor of ras-mediated transcription, proliferation, and transformation. *Mol Cell Biol* **24**:7514-7523.
89. **Garcia-Silva, S., O. Martinez-Iglesias, L. Ruiz-Llorente, and A. Aranda.** 2011. Thyroid hormone receptor beta1 domains responsible for the antagonism with the ras oncogene: role of corepressors. *Oncogene* **30**:854-864.
90. **Garesse, R., and C. G. Vallejo.** 2001. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* **263**:1-16.
91. **Garstka, H. L., M. Facke, J. R. Escribano, and R. J. Wiesner.** 1994. Stoichiometry of mitochondrial transcripts and regulation of gene expression by mitochondrial transcription factor A. *Biochem Biophys Res Commun* **200**:619-626.
92. **Giguere, V.** 1999. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* **20**:689-725.
93. **Gonzalez-Sancho, J. M., V. Garcia, F. Bonilla, and A. Munoz.** 2003. Thyroid hormone receptors/THR genes in human cancer. *Cancer Lett* **192**:121-132.
94. **Gonzalez-Suarez, E., E. Samper, J. M. Flores, and M. A. Blasco.** 2000. Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nat Genet* **26**:114-117.
95. **Gopalakrishnan, L., and R. C. Scarpulla.** 1995. Structure, expression, and chromosomal assignment of the human gene encoding nuclear respiratory factor 1. *J Biol Chem* **270**:18019-18025.
96. **Gothe, S., Z. Wang, L. Ng, J. M. Kindblom, A. C. Barros, C. Ohlsson, B. Vennstrom, and D. Forrest.** 1999. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are

- viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev* **13**:1329-1341.
97. **Gottlicher, M., S. Heck, and P. Herrlich.** 1998. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med (Berl)* **76**:480-489.
  98. **Gugneja, S., and R. C. Scarpulla.** 1997. Serine phosphorylation within a concise amino-terminal domain in nuclear respiratory factor 1 enhances DNA binding. *J Biol Chem* **272**:18732-18739.
  99. **Guigon, C. J., D. W. Kim, M. C. Willingham, and S. Y. Cheng.** 2011. Mutation of thyroid hormone receptor-beta in mice predisposes to the development of mammary tumors. *Oncogene* **30**:3381-3390.
  100. **Gullberg, H., M. Rudling, D. Forrest, B. Angelin, and B. Vennstrom.** 2000. Thyroid hormone receptor beta-deficient mice show complete loss of the normal cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A) response to thyroid hormone but display enhanced resistance to dietary cholesterol. *Mol Endocrinol* **14**:1739-1749.
  101. **Gutteridge, J. M., and B. Halliwell.** 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* **899**:136-147.
  102. **Haberson, S. O.** 1874. Exophthalmic goiter, heart disease, jaundice: death. *Lancet* **1**:510-512.
  103. **Haffner, M. C., M. J. Aryee, A. Toubaji, D. M. Esopi, R. Albadine, B. Gurel, W. B. Isaacs, G. S. Bova, W. Liu, J. Xu, A. K. Meeker, G. Netto, A. M. De Marzo, W. G. Nelson, and S. Yegnasubramanian.** 2010. Androgen-induced TOP2B-mediated double-strand breaks and prostate cancer gene rearrangements. *Nat Genet* **42**:668-675.
  104. **Haffner, M. C., A. M. De Marzo, A. K. Meeker, W. G. Nelson, and S. Yegnasubramanian.** 2011. Transcription-induced DNA double strand breaks: both oncogenic force and potential therapeutic target? *Clin Cancer Res* **17**:3858-3864.
  105. **Hande, M. P., E. Samper, P. Lansdorp, and M. A. Blasco.** 1999. Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *J Cell Biol* **144**:589-601.
  106. **Hara, E., R. Smith, D. Parry, H. Tahara, S. Stone, and G. Peters.** 1996. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* **16**:859-867.
  107. **Harding, S. M., and R. G. Bristow.** 2012. Discordance between phosphorylation and recruitment of 53BP1 in response to DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* **11**:1432-1444.
  108. **Harvey, M., A. T. Sands, R. S. Weiss, M. E. Hegi, R. W. Wiseman, P. Pantazis, B. C. Giovanella, M. A. Tainsky, A. Bradley, and L. A. Donehower.** 1993. In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene* **8**:2457-2467.
  109. **Hawley, S. A., D. A. Pan, K. J. Mustard, L. Ross, J. Bain, A. M. Edelman, B. G. Frenguelli, and D. G. Hardie.** 2005. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* **2**:9-19.
  110. **Hayflick, L.** 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**:614-636.
  111. **Hekmat-Nejad, M., Z. You, M. C. Yee, J. W. Newport, and K. A. Cimprich.** 2000. Xenopus ATR is a replication-dependent chromatin-binding protein required for the DNA replication checkpoint. *Curr Biol* **10**:1565-1573.

112. **Helbing, C. C., K. Werry, D. Crump, D. Domanski, N. Veldhoen, and C. M. Bailey.** 2003. Expression profiles of novel thyroid hormone-responsive genes and proteins in the tail of *Xenopus laevis* tadpoles undergoing precocious metamorphosis. *Mol Endocrinol* **17**:1395-1409.
113. **Helleday, T., J. Lo, D. C. van Gent, and B. P. Engelward.** 2007. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* **6**:923-935.
114. **Herbig, U., W. A. Jobling, B. P. Chen, D. J. Chen, and J. M. Sedivy.** 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* **14**:501-513.
115. **Herzig, R. P., S. Scacco, and R. C. Scarpulla.** 2000. Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J Biol Chem* **275**:13134-13141.
116. **Hinkal, G. W., C. E. Gatz, N. Parikh, and L. A. Donehower.** 2009. Altered senescence, apoptosis, and DNA damage response in a mutant p53 model of accelerated aging. *Mech Ageing Dev* **130**:262-271.
117. **Hinkle, P. M., and P. A. Kinsella.** 1986. Thyroid hormone induction of an autocrine growth factor secreted by pituitary tumor cells. *Science* **234**:1549-1552.
118. **Hodin, R. A., M. A. Lazar, B. I. Wintman, D. S. Darling, R. J. Koenig, P. R. Larsen, D. D. Moore, and W. W. Chin.** 1989. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* **244**:76-79.
119. **Hong, S. H., C. W. Wong, and M. L. Privalsky.** 1998. Signaling by tyrosine kinases negatively regulates the interaction between transcription factors and SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) corepressor. *Mol Endocrinol* **12**:1161-1171.
120. **Hong, S. P., F. C. Leiper, A. Woods, D. Carling, and M. Carlson.** 2003. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:8839-8843.
121. **Horlein, A. J., A. M. Naar, T. Heinzel, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Soderstrom, C. K. Glass, and et al.** 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**:397-404.
122. **Hu, X., and M. A. Lazar.** 1999. The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* **402**:93-96.
123. **Huang, S. A., M. A. Mulcahey, A. Crescenzi, M. Chung, B. W. Kim, C. Barnes, W. Kuijt, H. Turano, J. Harney, and P. R. Larsen.** 2005. Transforming growth factor-beta promotes inactivation of extracellular thyroid hormones via transcriptional stimulation of type 3 iodothyronine deiodinase. *Mol Endocrinol* **19**:3126-3136.
124. **Hurley, R. L., K. A. Anderson, J. M. Franzone, B. E. Kemp, A. R. Means, and L. A. Witters.** 2005. The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* **280**:29060-29066.
125. **Hutter, E., H. Unterluggauer, A. Garedew, P. Jansen-Durr, and E. Gnaiger.** 2006. High-resolution respirometry--a modern tool in aging research. *Exp Gerontol* **41**:103-109.
126. **Irrcher, I., P. J. Adhihetty, T. Sheehan, A. M. Joseph, and D. A. Hood.** 2003. PPARGamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**:C1669-1677.

127. **Itahana, K., J. Campisi, and G. P. Dimri.** 2004. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* **5**:1-10.
128. **Izquierdo, J. M., and J. M. Cuezva.** 1993. Thyroid hormones promote transcriptional activation of the nuclear gene coding for mitochondrial beta-F1-ATPase in rat liver. *FEBS Lett* **323**:109-112.
129. **Jacobs, J. J., and T. de Lange.** 2004. Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr Biol* **14**:2302-2308.
130. **Joste, V., Z. Goitom, and B. D. Nelson.** 1989. Thyroid hormone regulation of nuclear-encoded mitochondrial inner membrane polypeptides of the liver. *Eur J Biochem* **184**:255-260.
131. **Ju, B. G., V. V. Lunyak, V. Perissi, I. Garcia-Bassets, D. W. Rose, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld.** 2006. A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* **312**:1798-1802.
132. **Kalderon, B., O. Hermesh, and J. Bar-Tana.** 1995. Mitochondrial permeability transition is induced by in vivo thyroid hormone treatment. *Endocrinology* **136**:3552-3556.
133. **Kalkhoven, E.** 2004. CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol* **68**:1145-1155.
134. **Kamiya, Y., M. Puzianowska-Kuznicka, P. McPhie, J. Nauman, S. Y. Cheng, and A. Nauman.** 2002. Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors is associated with human renal clear cell carcinoma. *Carcinogenesis* **23**:25-33.
135. **Kaneshige, M., K. Kaneshige, X. Zhu, A. Dace, L. Garrett, T. A. Carter, R. Kazlauskaitė, D. G. Pankratz, A. Wynshaw-Boris, S. Refetoff, B. Weintraub, M. C. Willingham, C. Barlow, and S. Cheng.** 2000. Mice with a targeted mutation in the thyroid hormone beta receptor gene exhibit impaired growth and resistance to thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13209-13214.
136. **Kelly, D. P., and R. C. Scarpulla.** 2004. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* **18**:357-368.
137. **Kliwer, S. A., K. Umesono, D. J. Mangelsdorf, and R. M. Evans.** 1992. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* **355**:446-449.
138. **Klion, F. M., R. Segal, and F. Schaffner.** 1971. The effect of altered thyroid function on the ultrastructure of the human liver. *Am J Med* **50**:317-324.
139. **Kluza, J., P. Marchetti, M. A. Gallego, S. Lancel, C. Fournier, A. Loyens, J. C. Beauvillain, and C. Bailly.** 2004. Mitochondrial proliferation during apoptosis induced by anticancer agents: effects of doxorubicin and mitoxantrone on cancer and cardiac cells. *Oncogene* **23**:7018-7030.
140. **Koibuchi, N., and W. W. Chin.** 2000. Thyroid hormone action and brain development. *Trends Endocrinol Metab* **11**:123-128.
141. **Kress, E., A. Rezza, J. Nadjari, J. Samarut, and M. Plateroti.** 2008. The thyroid hormone receptor-alpha (TRalpha) gene encoding TRalpha1 controls deoxyribonucleic acid damage-induced tissue repair. *Mol Endocrinol* **22**:47-55.
142. **Kuilman, T., C. Michaloglou, L. C. Vredevelde, S. Douma, R. van Doorn, C. J. Desmet, L. A. Aarden, W. J. Mooi, and D. S. Peeper.** 2008. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**:1019-1031.
143. **Lanni, A., M. Moreno, M. Cioffi, and F. Goglia.** 1993. Effect of 3,3'-di-iodothyronine and 3,5-di-iodothyronine on rat liver mitochondria. *J Endocrinol* **136**:59-64.

144. **Lanni, A., M. Moreno, M. Cioffi, and F. Goglia.** 1992. Effect of 3,3'-diiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on rat liver oxidative capacity. *Mol Cell Endocrinol* **86**:143-148.
145. **Lanz, R. B., and S. Rusconi.** 1994. A conserved carboxy-terminal subdomain is important for ligand interpretation and transactivation by nuclear receptors. *Endocrinology* **135**:2183-2195.
146. **Laudet, V.** 1997. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* **19**:207-226.
147. **Lazar, M. A.** 1993. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev* **14**:184-193.
148. **Le, O. N., F. Rodier, F. Fontaine, J. P. Coppe, J. Campisi, J. DeGregori, C. Laverdiere, V. Kokta, E. Haddad, and C. M. Beausejour.** 2010. Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status. *Aging Cell* **9**:398-409.
149. **Ledda-Columbano, G. M., A. Perra, R. Loi, H. Shinozuka, and A. Columbano.** 2000. Cell proliferation induced by triiodothyronine in rat liver is associated with nodule regression and reduction of hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* **60**:603-609.
150. **Leduc, F., H. Brauch, C. Hajj, A. Dobrovic, F. Kaye, A. Gazdar, J. W. Harbour, O. S. Pettengill, G. D. Sorenson, A. van den Berg, and et al.** 1989. Loss of heterozygosity in a gene coding for a thyroid hormone receptor in lung cancers. *Am J Hum Genet* **44**:282-287.
151. **Lee, B. Y., J. A. Han, J. S. Im, A. Morrone, K. Johung, E. C. Goodwin, W. J. Kleijer, D. DiMaio, and E. S. Hwang.** 2006. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **5**:187-195.
152. **Lee, J. H., and T. T. Paull.** 2007. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* **26**:7741-7748.
153. **Lee, J. H., and T. T. Paull.** 2005. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**:551-554.
154. **Lee, S., and M. L. Privalsky.** 2005. Heterodimers of retinoic acid receptors and thyroid hormone receptors display unique combinatorial regulatory properties. *Mol Endocrinol* **19**:863-878.
155. **Lelliott, C. J., G. Medina-Gomez, N. Petrovic, A. Kis, H. M. Feldmann, M. Bjursell, N. Parker, K. Curtis, M. Campbell, P. Hu, D. Zhang, S. E. Litwin, V. G. Zaha, K. T. Fountain, S. Boudina, M. Jimenez-Linan, M. Blount, M. Lopez, A. Meirhaeghe, Y. M. Bohlooly, L. Storlien, M. Stromstedt, M. Snaith, M. Oresic, E. D. Abel, B. Cannon, and A. Vidal-Puig.** 2006. Ablation of PGC-1beta results in defective mitochondrial activity, thermogenesis, hepatic function, and cardiac performance. *PLoS Biol* **4**:e369.
156. **Li, Z., Z. H. Meng, R. Chandrasekaran, W. L. Kuo, C. C. Collins, J. W. Gray, and S. H. Dairkee.** 2002. Biallelic inactivation of the thyroid hormone receptor beta1 gene in early stage breast cancer. *Cancer Res* **62**:1939-1943.
157. **Lin, C., L. Yang, B. Tanasa, K. Hutt, B. G. Ju, K. Ohgi, J. Zhang, D. W. Rose, X. D. Fu, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld.** 2009. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell* **139**:1069-1083.
158. **Lin, H. M., L. Zhao, and S. Y. Cheng.** 2002. Cyclin D1 Is a Ligand-independent Co-repressor for Thyroid Hormone Receptors. *J Biol Chem* **277**:28733-28741.



159. **Lin, K. H., H. Y. Shieh, S. L. Chen, and H. C. Hsu.** 1999. Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Carcinog* **26**:53-61.
160. **Lin, K. H., Y. H. Wu, and S. L. Chen.** 2001. Impaired interaction of mutant thyroid hormone receptors associated with human hepatocellular carcinoma with transcriptional coregulators. *Endocrinology* **142**:653-662.
161. **Lin, K. H., X. G. Zhu, H. C. Hsu, S. L. Chen, H. Y. Shieh, S. T. Chen, P. McPhie, and S. Y. Cheng.** 1997. Dominant negative activity of mutant thyroid hormone  $\alpha 1$  receptors from patients with hepatocellular carcinoma. *Endocrinology* **138**:5308-5315.
162. **Lindahl, T.** 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**:709-715.
163. **Liochev, S. I., and I. Fridovich.** 2000. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase can act as a superoxide reductase and a superoxide oxidase. *J Biol Chem* **275**:38482-38485.
164. **Lodish H, B. A., Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. .** 2004. *Molecular Biology of the Cell* 5th ed, WH Freeman: New York, NY.
165. **Lopez, M., L. Varela, M. J. Vazquez, S. Rodriguez-Cuenca, C. R. Gonzalez, V. R. Velagapudi, D. A. Morgan, E. Schoenmakers, K. Agassandian, R. Lage, P. B. Martinez de Morentin, S. Tovar, R. Nogueiras, D. Carling, C. Lelliott, R. Gallego, M. Oresic, K. Chatterjee, A. K. Saha, K. Rahmouni, C. Dieguez, and A. Vidal-Puig.** 2010. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med* **16**:1001-1008.
166. **Lopez-Contreras, A. J., and O. Fernandez-Capetillo.** 2010. The ATR barrier to replication-born DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **9**:1249-1255.
167. **Lopez-Contreras, A. J., P. Gutierrez-Martinez, J. Specks, S. Rodrigo-Perez, and O. Fernandez-Capetillo.** 2012. An extra allele of Chk1 limits oncogene-induced replicative stress and promotes transformation. *J Exp Med* **209**:455-461.
168. **Loschen, G., A. Azzi, C. Richter, and L. Flohe.** 1974. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* **42**:68-72.
169. **Loschen, G., L. Flohe, and B. Chance.** 1971. Respiratory chain linked  $H(2)O(2)$  production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett* **18**:261-264.
170. **Lowe, S. W., E. Cepero, and G. Evan.** 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**:307-315.
171. **Lowndes, N. F., and J. R. Murguia.** 2000. Sensing and responding to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* **10**:17-25.
172. **Luciakova, K., and B. D. Nelson.** 1992. Transcript levels for nuclear-encoded mammalian mitochondrial respiratory-chain components are regulated by thyroid hormone in an uncoordinated fashion. *Eur J Biochem* **207**:247-251.
173. **Macip, S., M. Igarashi, P. Berggren, J. Yu, S. W. Lee, and S. A. Aaronson.** 2003. Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol Cell Biol* **23**:8576-8585.
174. **Magnus-Levy, A.** 1895. Über den respiratorischen Gaswechsel unter dem Einfluss der Thyroidea so wie unter verschiedenen pathologischen Zuständen. *Berl Klin Wochenschr* **32**:650.
175. **Mahajan, M. A., and H. H. Samuels.** 2005. Nuclear hormone receptor coregulator: role in hormone action, metabolism, growth, and development. *Endocr Rev* **26**:583-597.

176. **Maldonado, E., R. Shiekhatar, M. Sheldon, H. Cho, R. Drapkin, P. Rickert, E. Lees, C. W. Anderson, S. Linn, and D. Reinberg.** 1996. A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature* **381**:86-89.
177. **Malewicz, M., B. Kadkhodaei, N. Kee, N. Volakakis, U. Hellman, K. Viktorsson, C. Y. Leung, B. Chen, R. Lewensohn, D. C. van Gent, D. J. Chen, and T. Perlmann.** 2011. Essential role for DNA-PK-mediated phosphorylation of NR4A nuclear orphan receptors in DNA double-strand break repair. *Genes Dev* **25**:2031-2040.
178. **Malik, R., and H. Hodgson.** 2002. The relationship between the thyroid gland and the liver. *QJM* **95**:559-569.
179. **Malik, R., N. Mellor, C. Selden, and H. Hodgson.** 2003. Triiodothyronine enhances the regenerative capacity of the liver following partial hepatectomy. *Hepatology* **37**:79-86.
180. **Mallette, F. A., M. F. Gaumont-Leclerc, and G. Ferbeyre.** 2007. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* **21**:43-48.
181. **Martinez-Iglesias, O., S. Garcia-Silva, J. Regadera, and A. Aranda.** 2009. Hypothyroidism enhances tumor invasiveness and metastasis development. *PLoS One* **4**:e6428.
182. **Martinez-Iglesias, O., S. Garcia-Silva, S. P. Tenbaum, J. Regadera, F. Larcher, J. M. Paramio, B. Vennstrom, and A. Aranda.** 2009. Thyroid hormone receptor beta1 acts as a potent suppressor of tumor invasiveness and metastasis. *Cancer Res* **69**:501-509.
183. **Mason, D. X., T. J. Jackson, and A. W. Lin.** 2004. Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence. *Oncogene* **23**:9238-9246.
184. **Mayeur, G. L., W. J. Kung, A. Martinez, C. Izumiya, D. J. Chen, and H. J. Kung.** 2005. Ku is a novel transcriptional recycling coactivator of the androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem* **280**:10827-10833.
185. **McVey, M., and S. E. Lee.** 2008. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet* **24**:529-538.
186. **Mendez-Pertuz, M., A. Sanchez-Pacheco, and A. Aranda.** 2003. The thyroid hormone receptor antagonizes CREB-mediated transcription. *EMBO J* **22**:3102-3112.
187. **Michaloglou, C., L. C. Vredeveld, M. S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C. M. van der Horst, D. M. Majoor, J. W. Shay, W. J. Mooi, and D. S. Peeper.** 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**:720-724.
188. **Miller, L. D., K. S. Park, Q. M. Guo, N. W. Alkharouf, R. L. Malek, N. H. Lee, E. T. Liu, and S. Y. Cheng.** 2001. Silencing of Wnt signaling and activation of multiple metabolic pathways in response to thyroid hormone-stimulated cell proliferation. *Mol Cell Biol* **21**:6626-6639.
189. **Miranda, S., R. Foncea, J. Guerrero, and F. Leighton.** 1999. Oxidative stress and upregulation of mitochondrial biogenesis genes in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* **258**:44-49.
190. **Mirochnik, Y., D. Veliceasa, L. Williams, K. Maxwell, A. Yemelyanov, I. Budunova, and O. V. Volpert.** 2012. Androgen receptor drives cellular senescence. *PLoS One* **7**:e31052.
191. **Mitsushashi, T., and V. M. Nikodem.** 1989. Regulation of expression of the alternative mRNAs of the rat alpha-thyroid hormone receptor gene. *J Biol Chem* **264**:8900-8904.

192. **Mitsubishi, T., G. E. Tennyson, and V. M. Nikodem.** 1988. Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:5804-5808.
193. **Miura, T., M. P. Mattson, and M. S. Rao.** 2004. Cellular lifespan and senescence signaling in embryonic stem cells. *Aging Cell* **3**:333-343.
194. **Mladenov, E., and G. Iliakis.** 2011. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res* **711**:61-72.
195. **Mo, X., and W. S. Dynan.** 2002. Subnuclear localization of Ku protein: functional association with RNA polymerase II elongation sites. *Mol Cell Biol* **22**:8088-8099.
196. **Mobley, J. A., and R. W. Brueggemeier.** 2004. Estrogen receptor-mediated regulation of oxidative stress and DNA damage in breast cancer. *Carcinogenesis* **25**:3-9.
197. **Moeller, L. C., X. Cao, A. M. Dumitrescu, H. Seo, and S. Refetoff.** 2006. Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nucl Recept Signal* **4**:e020.
198. **Moore, J. M., and R. K. Guy.** 2005. Coregulator interactions with the thyroid hormone receptor. *Mol Cell Proteomics* **4**:475-482.
199. **Moras, D., and H. Gronemeyer.** 1998. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **10**:384-391.
200. **Mutvei, A., S. Kuzela, and B. D. Nelson.** 1989. Control of mitochondrial transcription by thyroid hormone. *Eur J Biochem* **180**:235-240.
201. **Naik, E., and V. M. Dixit.** 2011. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med* **208**:417-420.
202. **Nakamura, A. J., Y. J. Chiang, K. S. Hathcock, I. Horikawa, O. A. Sedelnikova, R. J. Hodes, and W. M. Bonner.** 2008. Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics Chromatin* **1**:6.
203. **Ng, L., J. B. Hurley, B. Dierks, M. Srinivas, C. Salto, B. Vennstrom, T. A. Reh, and D. Forrest.** 2001. A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nat Genet* **27**:94-98.
204. **Niu, Y., S. Altuwaijri, K. P. Lai, C. T. Wu, W. A. Ricke, E. M. Messing, J. Yao, S. Yeh, and C. Chang.** 2008. Androgen receptor is a tumor suppressor and proliferator in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:12182-12187.
205. **Nobes, C. D., G. C. Brown, P. N. Olive, and M. D. Brand.** 1990. Non-ohmic proton conductance of the mitochondrial inner membrane in hepatocytes. *J Biol Chem* **265**:12903-12909.
206. **Ohtsuiji, M., F. Katsuoka, A. Kobayashi, H. Aburatani, J. D. Hayes, and M. Yamamoto.** 2008. Nrf1 and Nrf2 play distinct roles in activation of antioxidant response element-dependent genes. *J Biol Chem* **283**:33554-33562.
207. **Okoh, V., A. Deoraj, and D. Roy.** 2011. Estrogen-induced reactive oxygen species-mediated signalings contribute to breast cancer. *Biochim Biophys Acta* **1815**:115-133.
208. **Oppenheimer, J. H., and H. L. Schwartz.** 1997. Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocr Rev* **18**:462-475.
209. **Oppenheimer, J. H., H. L. Schwartz, C. N. Mariash, W. B. Kinlaw, N. C. Wong, and H. C. Freake.** 1987. Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr Rev* **8**:288-308.



210. **Osborn, A. J., S. J. Elledge, and L. Zou.** 2002. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol* **12**:509-516.
211. **Palmero, I., and M. Serrano.** 2001. Induction of senescence by oncogenic Ras. *Methods Enzymol* **333**:247-256.
212. **Pamplona, R., M. Portero-Otin, C. Ruiz, M. J. Bellmunt, J. R. Requena, S. R. Thorpe, J. W. Baynes, M. Romero, M. Lopez-Torres, and G. Barja.** 1999. Thyroid status modulates glycoxidative and lipoxidative modification of tissue proteins. *Free Radic Biol Med* **27**:901-910.
213. **Pandita, T. K., H. B. Lieberman, D. S. Lim, S. Dhar, W. Zheng, Y. Taya, and M. B. Kastan.** 2000. Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene* **19**:1386-1391.
214. **Parrinello, S., E. Samper, A. Krtolica, J. Goldstein, S. Melov, and J. Campisi.** 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* **5**:741-747.
215. **Pascual, A., and A. Aranda.** 2012. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim Biophys Acta*.
216. **Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert, and W. M. Bonner.** 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* **10**:886-895.
217. **Pear, W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott, and D. Baltimore.** 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:8392-8396.
218. **Perez-Juste, G., and A. Aranda.** 1999. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) is involved in thyroid hormone-mediated neuronal differentiation. *J Biol Chem* **274**:5026-5031.
219. **Perez-Juste, G., S. Garcia-Silva, and A. Aranda.** 2000. An element in the region responsible for premature termination of transcription mediates repression of c-myc gene expression by thyroid hormone in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **275**:1307-1314.
220. **Perillo, B., M. N. Ombra, A. Bertoni, C. Cuzzo, S. Sacchetti, A. Sasso, L. Chiariotti, A. Malorni, C. Abbondanza, and E. V. Avvedimento.** 2008. DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression. *Science* **319**:202-206.
221. **Perissi, V., L. M. Staszewski, E. M. McInerney, R. Kurokawa, A. Krones, D. W. Rose, M. H. Lambert, M. V. Milburn, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld.** 1999. Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* **13**:3198-3208.
222. **Perra, A., M. A. Kowalik, M. Pibiri, G. M. Ledda-Columbano, and A. Columbano.** 2009. Thyroid hormone receptor ligands induce regression of rat preneoplastic liver lesions causing their reversion to a differentiated phenotype. *Hepatology* **49**:1287-1296.
223. **Pfahl, M.** 1993. Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev* **14**:651-658.
224. **Piantadosi, C. A., and H. B. Suliman.** 2006. Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1. *J Biol Chem* **281**:324-333.
225. **Pillar, T. M., and H. J. Seitz.** 1997. Thyroid hormone and gene expression in the regulation of mitochondrial respiratory function. *Eur J Endocrinol* **136**:231-239.

226. **Pissios, P., I. Tzamelis, P. Kushner, and D. D. Moore.** 2000. Dynamic stabilization of nuclear receptor ligand binding domains by hormone or corepressor binding. *Mol Cell* **6**:245-253.
227. **Plateroti M, K. E., Samarut J.** 2007. Specific actions of thyroid hormones during gut development: insights from animal models. *J. Pediatr Endocrinol Metab* **20**:119-122.
228. **Porlan, E., O. G. Vidaurre, and A. Rodriguez-Pena.** 2008. Thyroid hormone receptor-beta (TR beta 1) impairs cell proliferation by the transcriptional inhibition of cyclins D1, E and A2. *Oncogene* **27**:2795-2800.
229. **Powers, S. K., and S. L. Lennon.** 1999. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* **58**:1025-1033.
230. **Privalsky, M. L.** 2004. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol* **66**:315-360.
231. **Puigserver, P., Z. Wu, C. W. Park, R. Graves, M. Wright, and B. M. Spiegelman.** 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**:829-839.
232. **Puzianowska-Kuznicka, M., A. Krystyniak, A. Madej, S. Y. Cheng, and J. Nauman.** 2002. Functionally impaired TR mutants are present in thyroid papillary cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **87**:1120-1128.
233. **Quignodon, L., C. Grijota-Martinez, E. Compe, R. Guyot, N. Allioli, D. Laperriere, R. Walker, P. Meltzer, S. Mader, J. Samarut, and F. Flamant.** 2007. A combined approach identifies a limited number of new thyroid hormone target genes in post-natal mouse cerebellum. *J Mol Endocrinol* **39**:17-28.
234. **Ramirez, R. D., C. P. Morales, B. S. Herbert, J. M. Rohde, C. Passons, J. W. Shay, and W. E. Wright.** 2001. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* **15**:398-403.
235. **Rappold, I., K. Iwabuchi, T. Date, and J. Chen.** 2001. Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *J Cell Biol* **153**:613-620.
236. **Rastinejad, F., T. Perlmann, R. M. Evans, and P. B. Sigler.** 1995. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* **375**:203-211.
237. **Redon, C., D. Pilch, E. Rogakou, O. Sedelnikova, K. Newrock, and W. Bonner.** 2002. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* **12**:162-169.
238. **Reipert, S., J. Berry, M. F. Hughes, J. A. Hickman, and T. D. Allen.** 1995. Changes of mitochondrial mass in the hemopoietic stem cell line FDCP-mix after treatment with etoposide: a correlative study by multiparameter flow cytometry and confocal and electron microscopy. *Exp Cell Res* **221**:281-288.
239. **Renaud, J. P., N. Rochel, M. Ruff, V. Vivat, P. Chambon, H. Gronemeyer, and D. Moras.** 1995. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* **378**:681-689.
240. **Reznick, R. M., and G. I. Shulman.** 2006. The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis. *J Physiol* **574**:33-39.
241. **Robles, S. J., and G. R. Adami.** 1998. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* **16**:1113-1123.
242. **Rodier, F., J. P. Coppe, C. K. Patil, W. A. Hoeijmakers, D. P. Munoz, S. R. Raza, A. Freund, E. Campeau, A. R. Davalos, and J. Campisi.** 2009. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* **11**:973-979.

243. **Rodier, F., D. P. Munoz, R. Teachenor, V. Chu, O. Le, D. Bhaumik, J. P. Coppe, E. Campeau, C. M. Beausejour, S. H. Kim, A. R. Davalos, and J. Campisi.** 2011. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* **124**:68-81.
244. **Rogakou, E. P., C. Boon, C. Redon, and W. M. Bonner.** 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**:905-916.
245. **Rosenfeld, M. G., V. V. Lunyak, and C. K. Glass.** 2006. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* **20**:1405-1428.
246. **Rossi, D. J., C. H. Jamieson, and I. L. Weissman.** 2008. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* **132**:681-696.
247. **Saatcioglu, F., T. Deng, and M. Karin.** 1993. A novel cis element mediating ligand-independent activation by c-ErbA: implications for hormonal regulation. *Cell* **75**:1095-1105.
248. **Sachs, L. M.** 2004. Corepressor requirement and thyroid hormone receptor function during *Xenopus* development. *Vitam Horm* **68**:209-230.
249. **Sadana, P., Y. Zhang, S. Song, G. A. Cook, M. B. Elam, and E. A. Park.** 2007. Regulation of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-Ialpha) gene expression by the peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator (PGC-1) isoforms. *Mol Cell Endocrinol* **267**:6-16.
250. **Sambrook J., F. E. F., Maniatis T. (1989).** 2. Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press ed, Cold Spring Harbor, NY.
251. **Sanchez-Martinez, R., A. Zambrano, A. I. Castillo, and A. Aranda.** 2008. Vitamin D-dependent recruitment of corepressors to vitamin D/retinoid X receptor heterodimers. *Mol Cell Biol* **28**:3817-3829.
252. **Sanchez-Pacheco, A., T. Palomino, and A. Aranda.** 1995. Retinoic acid induces expression of the transcription factor GHF-1/Pit-1 in pituitary prolactin- and growth hormone-producing cell lines. *Endocrinology* **136**:5391-5398.
253. **Sano, M., and K. Fukuda.** 2008. Activation of mitochondrial biogenesis by hormesis. *Circ Res* **103**:1191-1193.
254. **Sap, J., A. Munoz, K. Damm, Y. Goldberg, J. Ghysdael, A. Leutz, H. Beug, and B. Vennstrom.** 1986. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* **324**:635-640.
255. **Scarpulla, R. C.** 2002. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1576**:1-14.
256. **Scarpulla, R. C.** 1997. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr* **29**:109-119.
257. **Scarpulla, R. C.** 1996. Nuclear respiratory factors and the pathways of nuclear-mitochondrial interaction. *Trends Cardiovasc Med* **6**:39-45.
258. **Schotta, G., M. Lachner, K. Sarma, A. Ebert, R. Sengupta, G. Reuter, D. Reinberg, and T. Jenuwein.** 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* **18**:1251-1262.
259. **Schreiber, S. N., R. Emter, M. B. Hock, D. Knutti, J. Cardenas, M. Podvinec, E. J. Oakeley, and A. Kralli.** 2004. The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:6472-6477.
260. **Serrano, M., and M. A. Blasco.** 2001. Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* **13**:748-753.

261. **Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach, and S. W. Lowe.** 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**:593-602.
262. **Shadel, G. S., and D. A. Clayton.** 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem* **66**:409-435.
263. **Shadel, G. S., and D. A. Clayton.** 1993. Mitochondrial transcription initiation. Variation and conservation. *J Biol Chem* **268**:16083-16086.
264. **Shamma, A., Y. Takegami, T. Miki, S. Kitajima, M. Noda, T. Obara, T. Okamoto, and C. Takahashi.** 2009. Rb Regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-ras isoprenylation. *Cancer Cell* **15**:255-269.
265. **Shao, D., and M. A. Lazar.** 1999. Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J Clin Invest* **103**:1617-1618.
266. **Shay, J. W., and I. B. Roninson.** 2004. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* **23**:2919-2933.
267. **Sherr, C. J., and F. McCormick.** 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**:103-112.
268. **Shih, C. H., S. L. Chen, C. C. Yen, Y. H. Huang, C. D. Chen, Y. S. Lee, and K. H. Lin.** 2004. Thyroid hormone receptor-dependent transcriptional regulation of fibrinogen and coagulation proteins. *Endocrinology* **145**:2804-2814.
269. **Silva, J. M., G. Dominguez, J. M. Gonzalez-Sancho, J. M. Garcia, J. Silva, C. Garcia-Andrade, A. Navarro, A. Munoz, and F. Bonilla.** 2002. Expression of thyroid hormone receptor/erbA genes is altered in human breast cancer. *Oncogene* **21**:4307-4316.
270. **Sisley, K., D. Curtis, I. G. Rennie, and R. C. Rees.** 1993. Loss of heterozygosity of the thyroid hormone receptor B in posterior uveal melanoma. *Melanoma Res* **3**:457-461.
271. **Smith, J. R., and O. M. Pereira-Smith.** 1996. Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science* **273**:63-67.
272. **Soucek, L., J. Whitfield, C. P. Martins, A. J. Finch, D. J. Murphy, N. M. Sodir, A. N. Karnezis, L. B. Swigart, S. Nasi, and G. I. Evan.** 2008. Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature* **455**:679-683.
273. **St Germain, D. L., V. A. Galton, and A. Hernandez.** 2009. Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology* **150**:1097-1107.
274. **St-Pierre, J., J. A. Buckingham, S. J. Roebuck, and M. D. Brand.** 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* **277**:44784-44790.
275. **St-Pierre, J., S. Drori, M. Uldry, J. M. Silvaggi, J. Rhee, S. Jager, C. Handschin, K. Zheng, J. Lin, W. Yang, D. K. Simon, R. Bachoo, and B. M. Spiegelman.** 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* **127**:397-408.
276. **Staniek, K., and H. Nohl.** 2000. Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochim Biophys Acta* **1460**:268-275.
277. **Stein, G. H., L. F. Drullinger, A. Soulard, and V. Dulic.** 1999. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* **19**:2109-2117.
278. **Stewart, G. S., B. Wang, C. R. Bignell, A. M. Taylor, and S. J. Elledge.** 2003. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* **421**:961-966.

279. **Stoykov, I., B. Zandieh-Doulabi, A. F. Moorman, V. Christoffels, W. M. Wiersinga, and O. Bakker.** 2006. Expression pattern and ontogenesis of thyroid hormone receptor isoforms in the mouse heart. *J Endocrinol* **189**:231-245.
280. **Sun, Y., K. E. Connors, and D. Q. Yang.** 2007. AICAR induces phosphorylation of AMPK in an ATM-dependent, LKB1-independent manner. *Mol Cell Biochem* **306**:239-245.
281. **Suzuki, A., G. Kusakai, A. Kishimoto, Y. Shimojo, T. Ogura, M. F. Lavin, and H. Esumi.** 2004. IGF-1 phosphorylates AMPK-alpha subunit in ATM-dependent and LKB1-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **324**:986-992.
282. **Suzuki, H., M. C. Willingham, and S. Y. Cheng.** 2002. Mice with a mutation in the thyroid hormone receptor beta gene spontaneously develop thyroid carcinoma: a mouse model of thyroid carcinogenesis. *Thyroid* **12**:963-969.
283. **Takai, H., A. Smogorzewska, and T. de Lange.** 2003. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* **13**:1549-1556.
284. **Tang, H. Y., H. Y. Lin, S. Zhang, F. B. Davis, and P. J. Davis.** 2004. Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. *Endocrinology* **145**:3265-3272.
285. **Tapia, G., P. Cornejo, V. Fernandez, and L. A. Videla.** 1999. Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation. *Toxicol Lett* **106**:209-214.
286. **Tata, J. R.** 1963. Inhibition of the biological action of thyroid hormones by actinomycin D and puromycin. *Nature* **197**:1167-1168.
287. **Tata, J. R., L. Ernster, and O. Lindberg.** 1962. Control of basal metabolic rate by thyroid hormones and cellular function. *Nature* **193**:1058-1060.
288. **Tata, J. R., L. Ernster, O. Lindberg, E. Arrhenius, S. Pedersen, and R. Hedman.** 1963. The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochem J* **86**:408-428.
289. **Tata, J. R., L. Ernster, and E. M. Suranyi.** 1962. Interaction between thyroid hormones and cellular constituents. I. Binding to isolated sub-cellular particles and sub-particulate fractions. *Biochim Biophys Acta* **60**:461-479.
290. **te Poele, R. H., A. L. Okorokov, L. Jardine, J. Cummings, and S. P. Joel.** 2002. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **62**:1876-1883.
291. **Thormeyer, D., and A. Baniahmad.** 1999. The v-erbA oncogene (review). *Int J Mol Med* **4**:351-358.
292. **Thormeyer, D., S. P. Tenbaum, R. Renkawitz, and A. Baniahmad.** 1999. EcR interacts with corepressors and harbours an autonomous silencing domain functional in both Drosophila and vertebrate cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **68**:163-169.
293. **Todaro, G. J., and H. Green.** 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* **17**:299-313.
294. **Trachootham, D., J. Alexandre, and P. Huang.** 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* **8**:579-591.
295. **Upadhyay, G., R. Singh, A. Kumar, S. Kumar, A. Kapoor, and M. M. Godbole.** 2004. Severe hyperthyroidism induces mitochondria-mediated apoptosis in rat liver. *Hepatology* **39**:1120-1130.
296. **Valko, M., H. Morris, and M. T. Cronin.** 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**:1161-1208.



297. **Vega-Nunez, E., A. Menendez-Hurtado, R. Garesse, A. Santos, and A. Perez-Castillo.** 1995. Thyroid hormone-regulated brain mitochondrial genes revealed by differential cDNA cloning. *J Clin Invest* **96**:893-899.
298. **Venditti, P., A. Bari, L. Di Stefano, A. Cardone, F. Della Ragione, M. D'Esposito, and S. Di Meo.** 2009. Involvement of PGC-1, NRF-1, and NRF-2 in metabolic response by rat liver to hormonal and environmental signals. *Mol Cell Endocrinol* **305**:22-29.
299. **Venditti, P., G. Chiellini, A. Bari, L. Di Stefano, R. Zucchi, A. Columbano, T. S. Scanlan, and S. Di Meo.** 2009. T3 and the thyroid hormone beta-receptor agonist GC-1 differentially affect metabolic capacity and oxidative damage in rat tissues. *J Exp Biol* **212**:986-993.
300. **Venditti, P., G. Chiellini, L. Di Stefano, G. Napolitano, R. Zucchi, A. Columbano, T. S. Scanlan, and S. Di Meo.** 2010. The TRbeta-selective agonist, GC-1, stimulates mitochondrial oxidative processes to a lesser extent than triiodothyronine. *J Endocrinol* **205**:279-289.
301. **Venditti, P., and S. Di Meo.** 2006. Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* **63**:414-434.
302. **Videla, L. A.** 2010. Hormetic responses of thyroid hormone calorogenesis in the liver: Association with oxidative stress. *IUBMB Life* **62**:460-466.
303. **Virbasius, J. V., and R. C. Scarpulla.** 1994. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:1309-1313.
304. **Virbasius, J. V., C. A. Virbasius, and R. C. Scarpulla.** 1993. Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev* **7**:380-392.
305. **Wagner, R. L., J. W. Apriletti, M. E. McGrath, B. L. West, J. D. Baxter, and R. J. Fletterick.** 1995. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* **378**:690-697.
306. **Wahl, G. M., and A. M. Carr.** 2001. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol* **3**:E277-286.
307. **Wainwright, L. J., A. Lasorella, and A. Iavarone.** 2001. Distinct mechanisms of cell cycle arrest control the decision between differentiation and senescence in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:9396-9400.
308. **Wang, C. S., K. H. Lin, and Y. C. Hsu.** 2002. Alterations of thyroid hormone receptor alpha gene: frequency and association with Nm23 protein expression and metastasis in gastric cancer. *Cancer Lett* **175**:121-127.
309. **Watson, J. D. B., T.A.; Bell, S.P.; Gann, A.; Levine M.; Losick, R.** 2004. *Molecular Biology of the Gene* (Chapter 9 and 10), Pearson Benjamin Cummings; CSHL Press. 5th ed.
310. **Wehling, M.** 1997. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* **59**:365-393.
311. **Wei, W., R. M. Hemmer, and J. M. Sedivy.** 2001. Role of p14(ARF) in replicative and induced senescence of human fibroblasts. *Mol Cell Biol* **21**:6748-6757.
312. **Weitzel, J. M., S. Hamann, M. Jauk, M. Lacey, A. Filbry, C. Radtke, K. A. Iwen, S. Kutz, A. Harneit, P. M. Lizardi, and H. J. Seitz.** 2003. Hepatic gene expression patterns in thyroid hormone-treated hypothyroid rats. *J Mol Endocrinol* **31**:291-303.

313. **Weitzel, J. M., and K. A. Iwen.** 2011. Coordination of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* **342**:1-7.
314. **Weitzel, J. M., C. Radtke, and H. J. Seitz.** 2001. Two thyroid hormone-mediated gene expression patterns in vivo identified by cDNA expression arrays in rat. *Nucleic Acids Res* **29**:5148-5155.
315. **West, A. P., I. E. Brodsky, C. Rahner, D. K. Woo, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. C. Walsh, Y. Choi, G. S. Shadel, and S. Ghosh.** 2011. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* **472**:476-480.
316. **Widlansky, M. E., and D. D. Gutterman.** 2011. Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* **15**:1517-1530.
317. **Wiesner, R. J., T. T. Kurowski, and R. Zak.** 1992. Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle. *Mol Endocrinol* **6**:1458-1467.
318. **Wigler, M., A. Pellicer, S. Silverstein, R. Axel, G. Urlaub, and L. Chasin.** 1979. DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:1373-1376.
319. **Wikstrom, L., C. Johansson, C. Salto, C. Barlow, A. Campos Barros, F. Baas, D. Forrest, P. Thoren, and B. Vennstrom.** 1998. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *EMBO J* **17**:455-461.
320. **Williams, G. R.** 2000. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol* **20**:8329-8342.
321. **Wong, R. H., I. Chang, C. S. Hudak, S. Hyun, H. Y. Kwan, and H. S. Sul.** 2009. A role of DNA-PK for the metabolic gene regulation in response to insulin. *Cell* **136**:1056-1072.
322. **Woodbine, L., H. Brunton, A. A. Goodarzi, A. Shibata, and P. A. Jeggo.** 2011. Endogenously induced DNA double strand breaks arise in heterochromatic DNA regions and require ataxia telangiectasia mutated and Artemis for their repair. *Nucleic Acids Res* **39**:6986-6997.
323. **Woods, A., S. R. Johnstone, K. Dickerson, F. C. Leiper, L. G. Fryer, D. Neumann, U. Schlattner, T. Wallimann, M. Carlson, and D. Carling.** 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* **13**:2004-2008.
324. **Wright, J. A., K. S. Keegan, D. R. Herendeen, N. J. Bentley, A. M. Carr, M. F. Hoekstra, and P. Concannon.** 1998. Protein kinase mutants of human ATR increase sensitivity to UV and ionizing radiation and abrogate cell cycle checkpoint control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7445-7450.
325. **Wrighton, K. H.** 2009. DNA repair: Time to switch. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**.
326. **Wrutniak, C., I. Cassar-Malek, S. Marchal, A. Rasclé, S. Heusser, J. M. Keller, J. Flechon, M. Dauca, J. Samarut, J. Ghysdael, and et al.** 1995. A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *J Biol Chem* **270**:16347-16354.
327. **Wrutniak C, C. G.** 1996. La voie d'action mitochondriale de la triiodothyronine: mythe ou réalité? *Med/Sci.* **12**:475-484.
328. **Wu, C. H., J. van Riggelen, A. Yetil, A. C. Fan, P. Bachireddy, and D. W. Felsher.** 2007. Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:13028-13033.
329. **Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla, and B. M. Spiegelman.** 1999. Mechanisms

- controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**:115-124.
330. **Wulf, A., A. Harneit, M. Kroger, M. Kebenko, M. G. Wetzel, and J. M. Weitzel.** 2008. T3-mediated expression of PGC-1alpha via a far upstream located thyroid hormone response element. *Mol Cell Endocrinol* **287**:90-95.
331. **Wyman, C., and R. Kanaar.** 2006. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* **40**:363-383.
332. **Yamauchi, M., F. Kambe, X. Cao, X. Lu, Y. Kozaki, Y. Oiso, and H. Seo.** 2008. Thyroid hormone activates adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta. *Mol Endocrinol* **22**:893-903.
333. **Yap, N., C. L. Yu, and S. Y. Cheng.** 1996. Modulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors by the tumor suppressor p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:4273-4277.
334. **Yen, P. M.** 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* **81**:1097-1142.
335. **Zaid, A., R. Li, K. Luciakova, P. Barath, S. Nery, and B. D. Nelson.** 1999. On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes. *J Bioenerg Biomembr* **31**:129-135.
336. **Zavacki, A. M., H. Ying, M. A. Christoffolete, G. Aerts, E. So, J. W. Harney, S. Y. Cheng, P. R. Larsen, and A. C. Bianco.** 2005. Type 1 iodothyronine deiodinase is a sensitive marker of peripheral thyroid status in the mouse. *Endocrinology* **146**:1568-1575.
337. **Zong, H., J. M. Ren, L. H. Young, M. Pypaert, J. Mu, M. J. Birnbaum, and G. I. Shulman.** 2002. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:15983-15987.





**Anexo**



# Thyroid receptor: roles in cancer

Ana Aranda, Olaia Martínez-Iglesias, Lidia Ruiz-Llorente, Verónica García-Carpizo and Alberto Zambrano

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Autónoma de Madrid, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain

**The thyroid hormone receptors, encoded by the TR $\alpha$  and TR $\beta$  genes, are ligand-dependent transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily. In addition to the role of these receptors in growth, development and metabolism, there is increasing evidence that they also inhibit transformation and act as tumor suppressors. Aberrant TR action, as well as receptor silencing, are common events in human cancer, and TRs also have an important role in tumor progression in experimental animal models, suggesting that these receptors constitute a novel therapeutic target in cancer. This review highlights recent studies on mechanisms by which loss of expression and/or function of these receptors results in a selective advantage for cellular transformation, tumor development and metastatic growth.**

## The thyroid hormone receptors

The thyroid hormones are important regulators of growth, development and metabolism. The actions of the thyroid hormones (thyroxine, T<sub>4</sub> and triiodothyronine, T<sub>3</sub>) are initiated by binding to nuclear receptors (TRs), the cellular counterparts of the retroviral *v-erbA* oncogene, which act as ligand-dependent transcription factors [1]. TRs are encoded by two genes,  $\alpha$  and  $\beta$ , located in human chromosomes 17 and 3, respectively, that give rise to different receptor isoforms. The major isoforms TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2 and TR $\alpha$ 1 are bona fide receptors that bind hormone with high affinity, whereas TR $\alpha$ 2 is unable to bind ligand and acts as a dominant-negative, blocking TR-mediated transcription [2].

TRs, as well as other nuclear hormone receptors, display a modular structure with several regions: a N-terminal region (A/B), a conserved DNA-binding domain (DBD) or region C composed of two zinc fingers responsible for DNA binding and sequence-specific recognition, a linker region D that contains residues essential for interaction with corepressors and a conserved E region that contains the ligand binding domain (LBD) and is responsible for dimerization [3].

TRs normally act by binding, generally as heterodimers with the retinoid X receptor (RXR), to DNA-response elements (TREs) located in regulatory regions of target genes (Figure 1). Unliganded TRs can act as strong constitutive repressors when bound to TREs due to their association with corepressors, such as NCoR (nuclear receptor corepressor) or SMRT (silencing mediator of retinoic and thyroid receptor) [4,5]. NCoR and SMRT are large modular proteins that serve as platforms for the formation of multicomponent repressor complexes that contain histone deacetylases and cause chromatin compaction.

Upon ligand binding the receptors undergo a conformational change [6] that allows the sequential recruitment of multiple coactivator complexes. Some of these proteins are chromatin-remodeling factors or possess histone modifying activity, whereas others might interact directly with the basic transcriptional machinery [7]. Recruitment of coactivator complexes to the target promoter causes chromatin decompaction and transcriptional activation. Both the receptors and their coregulators are targets of diverse post-translational modifications in response to external stimuli that influence their activity and modulate receptor-dependent gene expression [8] (Figure 1).

In addition to stimulating transcription, TRs also repress gene expression in a ligand-dependent manner. In some cases, hormone-dependent repression requires binding to negative TREs (nTREs). A rather common finding is that the unoccupied receptor increases transcription on nTREs, and ligand binding to TR reverses this stimulation. Although the properties of nTREs are not totally understood, corepressors and deacetylase activity are involved in ligand-dependent negative regulation [9].

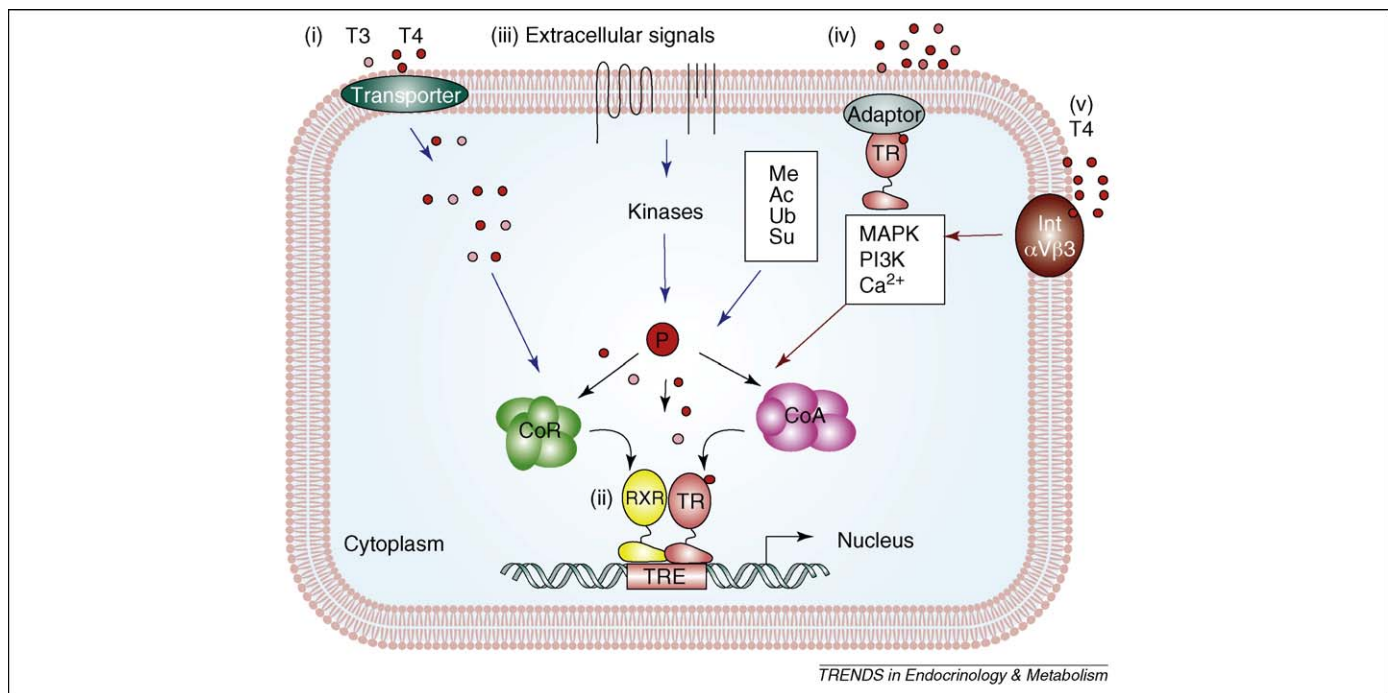
Nuclear receptors can also modulate gene expression independent of DNA binding [7]. Thus, they can alter expression of genes that do not contain a hormone response element through positive or negative interference with other transcription factors and signaling pathways, a mechanism generally referred to as “transcriptional crosstalk”. For example, TRs can negatively regulate target gene promoters that carry AP-1 (activator protein-1) or CRE (cAMP response element) sites. The receptors do not bind to these DNA elements themselves, but can be tethered to the promoter through protein–protein interactions [10,11].

Lastly, nuclear receptor ligands can elicit rapid responses, also called “non-genomic” or “non-genotropic”, which are not blocked by inhibitors of transcription or translation. These rapid actions could be mediated by a fraction of membrane-associated nuclear receptors, or by occupancy of a membrane receptor coupled through appropriate second-messenger systems to generate a biological response (Figure 1). Through these “non-genomic” mechanisms thyroid hormones could regulate the activity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) or phosphoinositol-3-kinase (PI3K), or induce Ca<sup>2+</sup> mobilization to provoke cellular effects [12–17].

## The *v-erbA* oncogene

The avian erythroblastosis virus (AEV) is an acute leukemogenic retrovirus that causes erythroleukemia and sarcoma in chickens. AEV encodes an oncogenic variant of the TR $\alpha$  gene that was fused to the viral gag gene during the

Corresponding author: Aranda, A. (aaranda@iib.uam.es).



**Figure 1.** Mechanism of thyroid hormone receptor action. (i) Thyroid hormones, thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) enter the cell through transporter proteins. Although the major form of thyroid hormone in the blood is T4, it is converted to the more active hormone T3 within cells by 5'-deiodinases. (ii) T3 binds to nuclear thyroid hormone receptors (TRs) that regulate transcription by binding, generally as heterodimers with the retinoid X receptor (RXR), to thyroid hormone response elements (TREs) located in regulatory regions of target genes. Activity is regulated by an exchange of corepressor (CoR) and coactivator (CoA) complexes. (iii) Receptor activity is also modulated by hormones and growth factors that stimulate diverse signal transduction pathways. Both receptors and coregulators are targets for phosphorylation (P) as well as for modifications, such as acetylation (Ac), methylation (Me), ubiquitination (Ub) or sumoylation (Su), that regulate their activity, levels or localization. (iv) Binding of T3 to a subpopulation of receptors located outside the nuclei can also elicit a response; through interaction with adaptor proteins, rapid "non-genomic" effects lead to stimulation of kinase pathways. (v) T4 can also bind to putative membrane receptors, such as integrin  $\alpha V\beta 3$ , inducing mitogen activated protein kinase (MAPK) activity.

genesis of AEV to give the *v-erbA* oncogene, and a second oncoprotein, *v-ErbB*, a mutated constitutively active receptor for epidermal growth factor. *v-ErbA* has no transformation capacity on its own, unless expressed at high levels, but it leads to a much more severe leukemic phenotype than *v-ErbB* alone [18]. In addition, the expression of *v-ErbA* alone is sufficient to efficiently arrest terminal differentiation of erythroid precursor cells and to cause an increased rate of proliferation [18].

In comparison with TR $\alpha$ , *v-erbA* contains N- and C-terminal deletions and 13 amino acid substitutions located in the DBD and LBD. Although *v-ErbA* has the capacity to bind corepressors, these mutations alter the specificity of DNA-binding, impair the ability of *v-ErbA* to dimerize with RXR, and abolish ligand binding, recruitment of coactivators and ligand-dependent transcriptional activation [19].

It has been suggested that the mutations acquired by *v-erbA* might be responsible for its oncogenicity by altering gene transcription [20], but the mechanism by which *v-ErbA* is oncogenic is not totally understood. It was initially shown that *v-ErbA* acts as a constitutive dominant repressor of transcription of genes regulated by TR (and also by the retinoic acid receptor, RAR), which is possibly involved in the differentiation program of the cell [18]. More recent results suggest that *v-ErbA* also modulates transcription of target genes that are neither under the control of TR or RAR, nor affected by the differentiation process, and could play a relevant role in transformation. Many *v-ErbA* repressed target genes are involved in two main cellular functions: chromatin structure/transcriptional regulation

and protein metabolism, whereas genes for which expression is upregulated by *v-ErbA* are fewer and are involved in a greater variety of functions, such as sodium-calcium exchange, chaperone activity, nuclear transport and others [21].

*v-ErbA* was believed to antagonize TR function merely through competition for response elements and/or coregulators [22]. However, its altered nuclear export capabilities could also contribute to its dominant-negative and oncogenic properties [23]. Indeed, *v-ErbA* can dimerize with either TR $\alpha$  or RXR in the nucleus and transport them to sequester a significant fraction of these receptors in the cytoplasm [24].

*v-ErbA* transforms avian erythroid progenitors by blocking their differentiation. In these cells, *v-ErbA* modulates the activity of signaling pathways involved in proliferation and differentiation. *v-ErbA* cooperates with the constitutively active *v-ErbB* or with ligand-activated *c-ErbB* or *c-Kit* to arrest differentiation and to induce leukemia [18]. Furthermore, cells expressing *v-ErbA* proliferate in the complete absence of TGF- $\beta$ , a transforming growth factor that controls the self-renewal of erythroid progenitors. *v-ErbA* could modulate the TGF- $\beta$  response of erythroid progenitors by deregulating the mTOR/p70S6K pathway, and this deregulation could play an important part in the transformation process because TGF- $\beta$  activation significantly interferes with the erythroid differentiation program [25].

#### TR mutations in human cancer

There is increasing evidence that reduced TR expression and/or alterations in TR genes are common events in

**Box 1. Hypothyroidism and cancer**

In contrast with the role of TRs as tumor suppressors, no unequivocal association between thyroidal status and human cancer has been demonstrated. It has been suggested that hypothyroidism might be a possible risk factor for liver cancer [65], but the connection between thyroid disorders and the pathogenesis of human breast cancer is a controversial issue. Beatson proposed the use of thyroid extracts for breast cancer treatment more than a century ago [66], and hypothyroidism has been described to be frequently found in cancer patients and associated with poor response to therapy (see references in Ref. [67]), whereas a more recent study reports that hypothyroid patients have a reduced incidence of primary breast carcinoma and a reduced risk of developing invasive disease [68]. Hypothyroidism also appears to be clinically favorable in patients with glioblastoma multiforme, because treatment with the antithyroid drug propylthiouracil in combination with tamoxifen increases survival [69]. However, these effects could be secondary to the important metabolic changes associated with hypothyroidism rather than to direct binding of the thyroid hormones to TRs in the tumor cells, as they often present inactivating mutations. This is also suggested by the finding that tumor development by *ras*-transformed fibroblasts, which do not express the receptor, is retarded in hypothyroid nude mice [38]. Alternatively, thyroid hormones could act on cells through a TR-independent mechanism. For example, it has been reported that direct binding of thyroid hormone (mainly T4) to the integrin  $\alpha V\beta 3$  receptor leads to MAPK (ERK1/2) activation and downstream events that cause thyroid hormone-induced angiogenesis and *in vitro* growth of glioma and breast cancer cells [16].

human cancer (Box 1). These alterations, comprehensively reviewed in Ref. [26], include loss of heterozygosity, gene rearrangements, promoter methylation, aberrant splicing and point mutations. Many tumors, including lung, breast, head and neck, melanoma, renal, uterine, ovarian and testicular tumors, present high frequencies of somatic deletions in chromosome 3p where TR $\beta$  lies. The TR $\alpha$  locus also undergoes frequent loss of heterozygosity in breast cancer, and rearrangement of the TR $\alpha$  gene occurs in breast and gastric cancer as well as leukemia. Besides large chromosomal defects, altered expression and small mutations in TR genes have also been reported, although the existence of “hot spot” areas for mutations in specific cell types is not clear. In particular, TR $\beta$  mutations are frequent in breast cancers, biallelic inactivation of this gene by promoter methylation is found in early stage breast cancer, and altered expression and anomalous sub-cellular localization of both TR $\alpha$  and TR $\beta$  has been found in these tumors [27]. Aberrant TRs have also been found in more than 70% of human hepatocellular carcinomas, and these mutant receptors have been shown to act as dominant-negative inhibitors of wild-type TR activity [28]. TR $\beta$  also appears to play a role in the development and progression of colorectal cancer [29]. The tendency for TR $\beta$  expression to disappear as malignancies progress suggests that TR $\beta$  can act as a tumor suppressor in human cancers; therefore, loss of expression and/or function of this receptor could result in cell transformation and tumor development.

**Role of TRs in cellular transformation, tumorigenesis and metastasis**

Although thyroid hormones stimulate proliferation of normal hepatocytes, administration of T3 or the TR $\beta$  agonist GC-1 induces regression of carcinogen-induced hepatic

nodules and reduces the incidence of hepatocarcinoma and lung metastasis in rats [30–32]. The finding that this inhibitory effect occurs in spite of a strong mitogenic action of T3 in the liver shows that enhanced cell proliferation is not sufficient for the progression to hepatocarcinoma [33] and suggests that TR-mediated mitogenic activity might be followed by a process of differentiation [31,32]. In contrast to the mitogenic effect of thyroid hormones in the liver, in hepatocarcinoma cells transfected with TR, T3 downregulates expression of pituitary tumor-transforming 1 (PTTG1), a critical mitotic checkpoint protein [34], and a TGF- $\beta$  neutralizing antibody can reverse the inhibitory effect of T3 on cell growth [2], suggesting that this TGF is required for the anticarcinogenic action of T3. As stated above, somatic mutations in both TR $\alpha$  and TR $\beta$  genes are present with high frequency in human hepatocarcinomas. These dominant-negative TR mutants present alterations in DNA recognition and in the relative affinity for the SMRT versus NCoR corepressors. Furthermore, whereas wild-type TRs interfere with c-Jun/AP-1 function and suppress anchorage independent growth, these mutants do not present these suppressive effects [28]. Although the precise contributions of mutant TRs to oncogenesis remain incompletely understood, their high frequency in these neoplasias suggests that they might represent a meaningful target for liver cancer therapy.

Our group has demonstrated the existence of crosstalk between TRs and the Ras signaling pathways initiated by the *ras* oncogene. Ras oncoproteins act as pivotal mediators of membrane signals by transferring information to the nucleus; activating mutations in *ras* are present in at least 30% of human tumors [35]. In N2a neuroblastoma cells that express TR $\beta$ 1 (N2a- $\beta$  cells), T3 coordinately regulates expression of several genes that play a key role in cell cycle control, among them *c-myc*, cyclin kinase inhibitors or *cyclin* D1 [36,37]. In these cells, T3 blocks oncogenic *ras*-mediated proliferation and antagonizes transcriptional induction of *cyclin* D1. Cyclin D1 plays an important role in cell cycle progression and is one of the main targets for the proliferative and transforming effects of the *ras* oncogene. TRs block Cyclin D1 induction by interfering with the activity of the Ras/MAPK/ribosomal S6 kinase (Rsk) pathway and CRE-mediated transcription [38]. TR $\beta$ 1 also impairs fibroblast proliferation and represses AP-1 activation of *cyclin* D1 transcription by inhibiting c-Jun expression and recruitment to its promoter binding sites [39]. Interestingly, *cyclin* D1 is one of the earliest genes upregulated following T3 treatment in liver [40,41] and in pituitary GC cells [42] in which the hormone induces mitogenic effects instead of reducing proliferation.

TRs not only antagonize *ras*-induced proliferation but more importantly they are able to block fibroblast transformation by both *ras* and *v-src* [38]. Furthermore, both TR $\alpha$  and TR $\beta$  act as suppressors of tumor formation by the *ras* oncogene in nude mice, suggesting that TRs play a relevant role as suppressors of *ras*-dependent tumors. Although both isoforms suppress tumor growth, TR $\beta$  appears to have stronger antitumorigenic effects [38].

To analyze the role of TRs in tumor progression and metastatic growth, we re-expressed TR $\beta$ 1 in hepatocarcinoma and breast cancer cell lines that had lost receptor



expression [43]. This reintroduction retards tumor growth, causes partial mesenchymal to epithelial cell transition and has a striking inhibitory effect on invasiveness, extravasation and metastasis formation in nude mice. In cultured hepatocarcinoma and breast cancer cells, TR $\beta$ 1 abolishes anchorage-independent growth and migration, disrupts the mitogenic action of growth factors by suppressing activation of MAPK and PI3K signaling pathways that are crucial for cell proliferation and invasiveness, and represses expression of genes, including growth factor receptors, chemokine receptors, c-met, cyclooxygenase 2 (cox2), inhibitor of differentiation 1 (Id1), or metalloproteases that are relevant for metastatic progression and bad prognosis in patients [44–47]. That endogenous TRs play a role in progression of benign tumors to invasive carcinomas is shown by the distinct response of wild-type and TR knockout mice lacking TR $\alpha$  and TR $\beta$  to a skin carcinogenesis protocol. TR knockout mice develop a lower number of tumors than controls, whereas tumor growth at late stages is significantly faster in animals devoid of the receptors [43]. Histopathologic evaluation of late stage skin tumors from these mice reveals that in contrast to the well-differentiated papillomas found in control mice, half of the tumors in TR knockout mice are either *in situ* or squamous cell carcinomas. These results show that TRs suppress malignant progression in this model of epithelial carcinogenesis and indicate again that these receptors can have divergent effects on cell proliferation and tumor aggressiveness.

#### A mouse model for follicular thyroid cancer and pituitary adenomas

Thyroid cancer constitutes the most frequent endocrine neoplasia. Early reports showed that TR $\beta$  mRNA levels were decreased in thyroid cancer but not in benign lesions [48]; also, a high frequency of mutations in papillary thyroid cancer [49] were found, suggesting a tumor suppressor role of TR $\beta$  in endocrine neoplasia. More recent work has confirmed reduced TR $\beta$  mRNA expression but has reported that TR $\beta$  mutations are rare events in sporadic thyroid tumors [50]. The study of the role of TR $\beta$  mutations in thyroid cancer has been addressed *in vivo* by generation of a knockin mouse model harboring a C-terminal 14 amino acid frameshift mutation (PV mutation) [51]. This mutant receptor, initially identified in a patient with thyroid hormone resistance (RTH) syndrome, has reduced or no T3-binding affinity or TR transcriptional activity and exhibits a strong dominant-negative effect. In humans, RTH is not associated with a higher cancer incidence [26]. However, RTH patients are heterozygous for the mutated allele, so it is possible that loss of function of both TR $\beta$  alleles is required for carcinoma progression. This is supported by the finding that TR $\beta^{PV/PV}$  (but not TR $\beta^{PV/+}$ ) mice develop follicular thyroid carcinoma similar to human thyroid cancer, with progression from hyperplasia to vascular invasion, capsular invasion, anaplasia and metastasis [51]. It should be mentioned that this knockin mouse model is unique because, as mentioned above, TR mutations are rarely seen in human thyroid carcinomas [50].

Gene profiling indicates that complex alterations of multiple signaling pathways induced by TR $\beta^{PV}$  could con-

tribute to thyroid carcinogenesis. Because proteasomal degradation of PTTG1 is regulated by the liganded TR $\beta$ , PTTG1 levels are high in the thyroid tumors of TR $\beta^{PV/PV}$  mice, leading to mitotic abnormalities [52].  $\beta$ -catenin, which plays a critical role in oncogenesis, is also highly elevated in these tumors, representing another activating mechanism potentially contributing to thyroid carcinogenesis [53]. The PI3K–AKT signaling pathway is activated in thyroid tumors of TR $\beta^{PV/PV}$  mice [54], and treatment with a PI3K inhibitor delays tumor progression and blocks metastatic growth [55]. Activation of the PI3K pathway appears to be mediated by a non-genomic action of TR $\beta^{PV}$  that involves a direct interaction of the mutant receptor with the p85 $\alpha$  regulatory subunit that increases the catalytic activity of the p110 subunit [13]. Furthermore, NCoR acts as a novel regulator of TR $\beta^{PV}$ -mediated activation of PI3K signaling via competition with the receptor for binding to the same p85 $\alpha$  domain. Therefore, this corepressor could be considered a tumor suppressor in the mouse model of thyroid cancer [13]. The activity of PI3K is negatively regulated by the protein phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog). A recent study demonstrated that PTEN deficiency accelerates tumor progression and increases lung metastasis formation in TR $\beta^{PV/PV}$  mice, reducing their survival. PTEN deficiency further activates AKT, increasing Cyclin D1 expression and decreasing apoptosis in TR $\beta^{PV/PV}$  thyroids [56]. Taken together, the results obtained with the TR $\beta^{PV/PV}$  mouse model demonstrate that the dominant-negative receptor interacts with multiple signaling pathways to induce thyroid carcinogenesis in mice.

In addition to thyroid carcinoma, TR $\beta^{PV/PV}$  mice also spontaneously develop thyrotropin-secreting pituitary adenomas (TSHomas). In these tumors, Cyclin D1 is overexpressed and the retinoblastoma protein is hyperphosphorylated [57]. In agreement with our previous results [10,38], liganded TR $\beta$  also represses *cyclin* D1 transcription in the pituitaries through the CRE and is recruited to the promoter via interaction with CREB (CRE binding protein) transcription factors. This repressive effect is lost in TR $\beta^{PV}$  mice, resulting in constitutive activation of Cyclin D1 expression and leading to aberrant thyrotrope proliferation [57]. Very recent results have shown that AKT and its downstream effectors are also activated in TR $\beta^{PV/PV}$  mice pituitaries. This activation inhibits proteasomal degradation of Cyclin D1 and could contribute to increased cell proliferation and aberrant pituitary growth [58]. Interestingly, TR $\beta$  mutations have been reported in patients with TSHomas [59,60]. Similar to TR $\beta^{PV/PV}$ , these TR $\beta$  mutants have impaired T3 binding and exhibit dominant-negative activity against wild-type TRs, suggesting that mutation of the TR $\beta$  gene is one of the genetic events underlying the tumorigenesis of TSH-producing tumors in humans, although spontaneous tumors are rarely found in TR knockout mice.

#### Can TRs also enhance carcinogenesis?

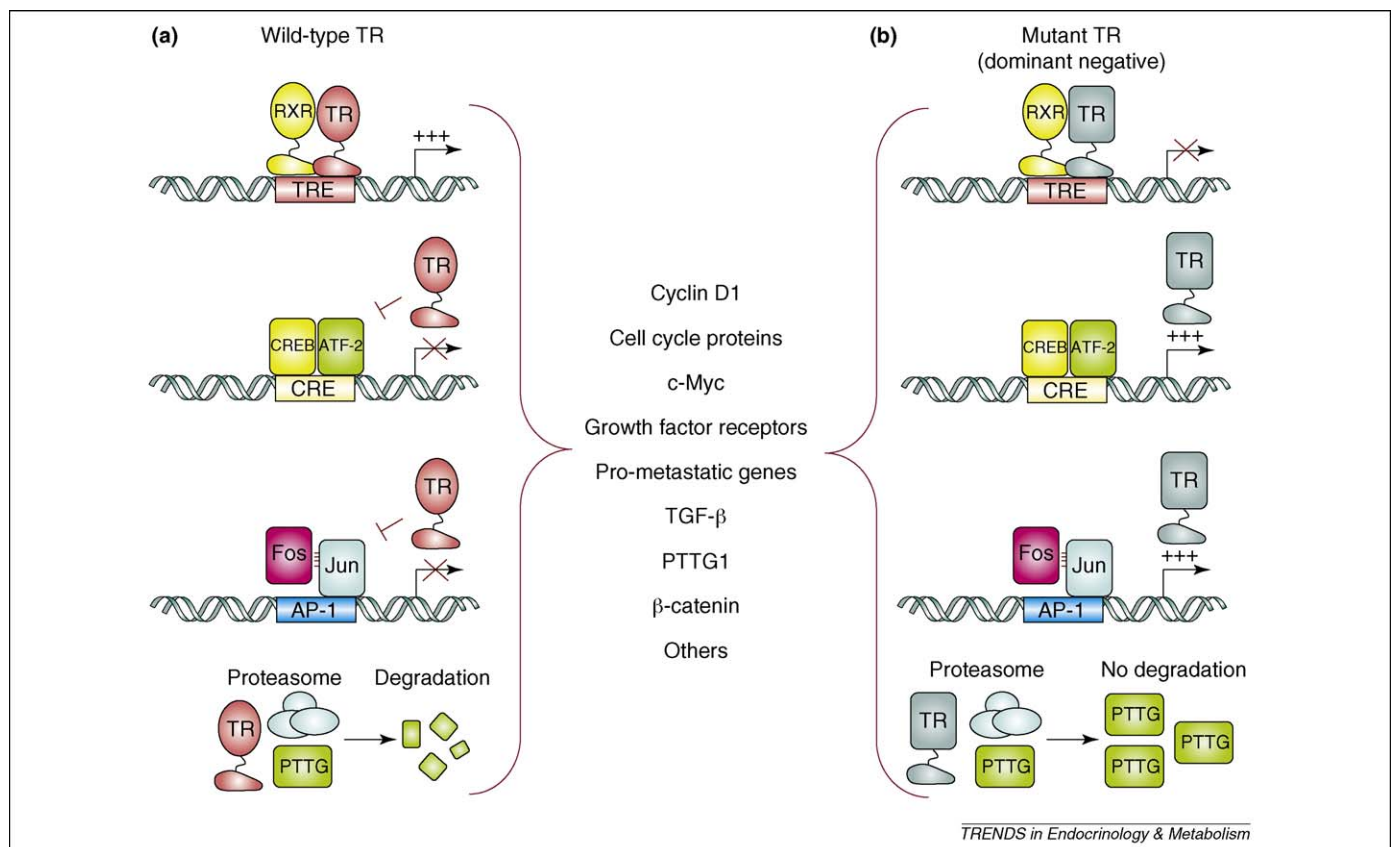
In addition to the studies describing that TRs can function as tumor suppressors, other reports, mainly obtained in cultured cells, support the concept that wild-type TR can enhance carcinogenesis. For instance, besides the

well-known role of thyroid hormones as stimulators of the proliferation of tumor pituitary cell lines [42], they have also been described to increase proliferation and to enhance the estrogen-mediated growth of MCF-7 and T47-D breast cancer cell lines [16,61]. T3 can also induce proliferation and increase estrogen receptor  $\alpha$  mRNA levels in ovarian surface epithelial cells, which could explain epidemiological links between hyperthyroidism and increased risk of ovarian cancer [62]. T3 also enhances proliferation of the prostatic cell line LNCaP by downregulating an antiproliferation gene, B-cell translocation gene 2 [63]. By contrast, studies with genetically modified mice have demonstrated that TR $\alpha$  is required for normal epithelial intestinal cell proliferation. T3 controls transcription of  $\beta$ -catenin in an epithelial cell-autonomous way [64]. As Wnt/ $\beta$ -catenin plays a crucial role in intestinal tumorigenesis, these observations open a new perspective on the study of TRs as potential tumor inducers.

These observations suggest that TRs could play a dual role in carcinogenesis. Because TR actions are complex and tissue- and time-specific, aberrant expression of the various TR isoforms might have divergent effects in different tumor cells or at different stages of tumor development.

### Concluding remarks

This review presents evidence obtained from both human and experimental animal studies that thyroid hormone receptors are important regulators of cell growth and malignant transformation. It is interesting to note that these receptors can play a dual role, because they are required for normal growth and proliferation of different tissues, but they can also act as growth suppressors in certain types of cancer cells. Interestingly, although TRs have ubiquitous expression in mammalian tissues, they can be absent or expressed at low levels in a number of transformed cells. Furthermore, these receptors are often mutated or their expression is inactivated in human cancer, suggesting their role as tumor suppressors. Indeed, characterization of the mutant receptors present in the tumors has shown that they often act as dominant negatives of wild-type TRs. Furthermore, v-erbA, a mutant TR $\alpha$ , and TR $\beta^{PV}$  that act as dominant-negative TRs cause cancer in animals. Accordingly, TR suppresses transformation, tumor growth and metastasis formation in experimental animals. Although many targets and mechanisms for the anti-oncogenic actions of TRs have already been identified (Figure 2), many questions remain to be answered before a complete understanding of their role



**Figure 2.** Proposed model for the anti-oncogenic actions of thyroid hormone receptors. (a) Wild-type thyroid hormone receptors (TRs) regulate expression of genes involved in cell proliferation, transformation and invasiveness through different mechanisms. The receptors can regulate gene transcription by binding to either positive or negative thyroid hormone response elements (TREs), and they can also transrepress expression of genes that contain activator protein 1 (AP-1) or cyclic AMP response elements (CRE) motifs. AP-1 motifs are binding sites for members of the Fos and Jun proto-oncogene family, and CRE motifs bind B-Zip transcription factors, such as CREB (cyclic AMP response element binding protein) or ATF-2 (activation transcription factor-2), that are targets of the Ras/mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway. In addition, TRs modulate gene expression by post-transcriptional mechanisms. For instance, they induce proteasomal degradation of key proteins, such as pituitary tumor-transforming 1 (PTTG-1) or  $\beta$ -catenin. (b) The mutant receptors associated with somatic mutations in human tumors, the viral v-ErbA oncoprotein or the PV mutant that induces tumors in mice, present a strong dominant-negative activity and act by antagonizing the actions of the native TRs. They lose the ability to regulate ligand-dependent transcription, of interfering with AP-1 or CRE activity, and of inducing protein degradation, leading to oncogenesis.



## Box 2. Future perspectives

- To fully understand the role of TRs in human cancer, further studies in patients are necessary to establish the correlation of specific TR $\alpha$  and TR $\beta$  alterations in tumors with clinical findings.
- More studies with normal and genetically modified animals are needed to elucidate the events *in vivo* that mediate the effects of these receptors on tumor progression.
- The delineation of downstream molecular events mediated by TRs is a crucial requirement for understanding their biological relevance in cancer. Particularly, the identification of the role of specific coregulators (coactivators and corepressors) of the anti-oncogenic TR actions could lead to the identification of novel molecular targets for intervention.
- Given that epigenetic modifications seem to play an important role in cancer, it is essential to determine the epigenetic changes (DNA methylation, histone modifications, etc.) triggered by these receptors that could result in alterations in the expression of genes associated with tumor initiation, invasiveness and metastasis.
- The cancer stem cell hypothesis states that a small subpopulation of cells within a tumor, with self-renewal capacity, is entirely responsible for maintaining tumorigenesis. Therefore, the possibility that TRs could alter cancer stem cell biology is also an important issue that should be addressed.
- MicroRNA (miRNA) expression is deregulated in cancer, and recent studies have shown that these non-coding RNAs play an important role in tumor initiation and progression. If we aim to understand the complex processes underlying the effects of TRs on malignant transformation, it should be noted that these receptors could transcriptionally or epigenetically deregulate miRNA expression in cancer cells.

in cancer (Box 2) and the general mechanism for TR-mediated suppression of transformation is still not conclusive. Given the important impact of this disease, clarifying the mechanisms by which TRs influence tumor progression and elucidating their roles in metastatic growth, which causes most deaths from solid tumors, should lead to a better understanding of the biology of cancer and its susceptibility to treatment in humans.

## Acknowledgements

This laboratory is supported by grants BFU2007-62402 from MEC; RD06/0020/0036 and Acción Transversal de Cáncer from FIS and from the EU Project CRESCENDO (FP6-018652).

## References

- 1 Flamant, F. *et al.* (2006) International Union of Pharmacology. LIX. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: thyroid hormone receptors. *Pharmacol. Rev.* 58, 705–711
- 2 Yen, P.M. *et al.* (2006) Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol. Cell. Endocrinol.* 246, 121–127
- 3 Aranda, A. and Pascual, A. (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* 81, 1269–1304
- 4 Lazar, M.A. (2003) Nuclear receptor corepressors. *Nucl. Recept. Signal.* 1, e001
- 5 Privalsky, M.L. (2004) The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 315–360
- 6 Gronemeyer, H. *et al.* (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 950–964
- 7 Rosenfeld, M.G. *et al.* (2006) Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev.* 20, 1405–1428
- 8 Han, S.J. *et al.* (2009) Multi-modulation of nuclear receptor coactivators through posttranslational modifications. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 8–15
- 9 Wang, D. *et al.* (2009) Negative regulation of TSH[ $\alpha$ ] target gene by thyroid hormone involves histone acetylation and corepressor complex dissociation. *Mol. Endocrinol.* 23, 600–609
- 10 Mendez-Pertuz, M. *et al.* (2003) The thyroid hormone receptor antagonizes CREB-mediated transcription. *EMBO J.* 22, 3102–3112
- 11 Rogatsky, I. *et al.* (2001) Factor recruitment and TIF2/GRIP1 corepressor activity at a collagenase-3 response element that mediates regulation by phorbol esters and hormones. *EMBO J.* 20, 6071–6083
- 12 Bergh, J.J. *et al.* (2005) Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 146, 2864–2871
- 13 Furuya, F. *et al.* (2009) Nongenomic activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by thyroid hormone receptors. *Steroids* 74, 628–634
- 14 Hiroi, Y. *et al.* (2006) Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 14104–14109
- 15 Storey, N.M. *et al.* (2006) Rapid signaling at the plasma membrane by a nuclear receptor for thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5197–5201
- 16 Davis, P.J. *et al.* (2008) Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 211–218
- 17 Yamauchi, M. *et al.* (2008) Thyroid hormone activates adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta. *Mol. Endocrinol.* 22, 893–903
- 18 Rietveld, L.E. *et al.* (2001) Avian erythroleukemia: a model for corepressor function in cancer. *Oncogene* 20, 3100–3109
- 19 Wolffe, A.P. *et al.* (2000) Thyroid hormone receptor, v-ErbA, and chromatin. *Vitam. Horm.* 58, 449–492
- 20 Lee, S. and Privalsky, M.L. (2005) Multiple mutations contribute to repression by the v-Erb A oncoprotein. *Oncogene* 24, 6737–6752
- 21 Bresson, C. *et al.* (2007) Large-scale analysis by SAGE reveals new mechanisms of v-erbA oncogene action. *BMC Genomics* 8, 390
- 22 Zubkova, I. and Subauste, J.S. (2004) V-erba homodimers mediate the potent dominant negative activity of v-erba on evicted repeats. *Mol. Biol. Rep.* 31, 131–137
- 23 Bonamy, G.M. *et al.* (2005) Cancer promoted by the oncoprotein v-ErbA may be due to subcellular mislocalization of nuclear receptors. *Mol. Endocrinol.* 19, 1213–1230
- 24 Bonamy, G.M. and Allison, L.A. (2006) Oncogenic conversion of the thyroid hormone receptor by altered nuclear transport. *Nucl. Recept. Signal.* 4, e008
- 25 Gonin-Giraud, S. *et al.* (2008) Involvement of the TGF-beta and mTOR/p70S6Kinase pathways in the transformation process induced by v-ErbA. *Leuk. Res.* 32, 1878–1888
- 26 Gonzalez-Sancho, J.M. *et al.* (2003) Thyroid hormone receptors/THR genes in human cancer. *Cancer Lett.* 192, 121–132
- 27 Conde, I. *et al.* (2006) Influence of thyroid hormone receptors on breast cancer cell proliferation. *Ann. Oncol.* 17, 60–64
- 28 Chan, I.H. and Privalsky, M.L. (2006) Thyroid hormone receptors mutated in liver cancer function as distorted antimorphs. *Oncogene* 25, 3576–3588
- 29 Horkko, T.T. *et al.* (2006) Thyroid hormone receptor beta1 in normal colon and colorectal cancer-association with differentiation, polypoid growth type and K-ras mutations. *Int. J. Cancer* 118, 1653–1659
- 30 Columbano, A. *et al.* (2006) The thyroid hormone receptor-beta agonist GC-1 induces cell proliferation in rat liver and pancreas. *Endocrinology* 147, 3211–3218
- 31 Columbano, A. *et al.* (2008) Triiodothyronine stimulates hepatocyte proliferation in two models of impaired liver regeneration. *Cell Prolif.* 41, 521–531
- 32 Perra, A. *et al.* (2009) Thyroid hormone receptor ligands induce regression of rat preneoplastic liver lesions causing their reversion to a differentiated phenotype. *Hepatology* 49, 1287–1296
- 33 Ledda-Columbano, G.M. *et al.* (2000) Cell proliferation induced by triiodothyronine in rat liver is associated with nodule regression and reduction of hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 60, 603–609
- 34 Chen, R.N. *et al.* (2008) Thyroid hormone receptors suppress pituitary tumor transforming gene 1 activity in hepatoma. *Cancer Res.* 68, 1697–1706
- 35 Bos, J.L. (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49, 4682–4689
- 36 Perez-Juste, G. and Aranda, A. (1999) The cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) is involved in thyroid hormone-mediated neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* 274, 5026–5031

- 37 Perez-Juste, G. *et al.* (2000) An element in the region responsible for premature termination of transcription mediates repression of c-myc gene expression by thyroid hormone in neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 275, 1307–1314
- 38 Garcia-Silva, S. and Aranda, A. (2004) The thyroid hormone receptor is a suppressor of ras-mediated transcription, proliferation, and transformation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7514–7523
- 39 Porlan, E. *et al.* (2008) Thyroid hormone receptor-beta (TR beta 1) impairs cell proliferation by the transcriptional inhibition of cyclins D1, E and A2. *Oncogene* 27, 2795–2800
- 40 Bungay, A. *et al.* (2008) Microarray analysis of mitogenic effects of T3 on the rat liver. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, 1926–1933
- 41 Pibiri, M. *et al.* (2001) Cyclin D1 is an early target in hepatocyte proliferation induced by thyroid hormone (T3). *FASEB J.* 15, 1006–1013
- 42 Barrera-Hernandez, G. *et al.* (1999) Thyroid hormone-induced cell proliferation in GC cells is mediated by changes in G1 cyclin/cyclin-dependent kinase levels and activity. *Endocrinology* 140, 5267–5274
- 43 Martinez-Iglesias, O. *et al.* (2009) Thyroid hormone receptor beta1 acts as a potent suppressor of tumor invasiveness and metastasis. *Cancer Res.* 69, 501–509
- 44 Minn, A.J. *et al.* (2007) Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6740–6745
- 45 Minn, A.J. *et al.* (2005) Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436, 518–524
- 46 Uchida, H. *et al.* (2006) Chemokine receptor CCR6 as a prognostic factor after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21, 161–168
- 47 Yang, X. *et al.* (2006) Essential contribution of a chemokine, CCL3, and its receptor, CCR1, to hepatocellular carcinoma progression. *Int. J. Cancer* 118, 1869–1876
- 48 Bronnegard, M. *et al.* (1994) Expression of thyrotropin receptor and thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 384–389
- 49 Puzianowska-Kuznicka, M. *et al.* (2002) Functionally impaired TR mutants are present in thyroid papillary cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1120–1128
- 50 Rocha, A.S. *et al.* (2007) Thyroid hormone receptor beta mutations in the 'hot-spot region' are rare events in thyroid carcinomas. *J. Endocrinol.* 192, 83–86
- 51 Suzuki, H. *et al.* (2002) Mice with a mutation in the thyroid hormone receptor beta gene spontaneously develop thyroid carcinoma: a mouse model of thyroid carcinogenesis. *Thyroid* 12, 963–969
- 52 Ying, H. *et al.* (2006) Aberrant accumulation of PTTG1 induced by a mutated thyroid hormone beta receptor inhibits mitotic progression. *J. Clin. Invest.* 116, 2972–2984
- 53 Guigon, C.J. *et al.* (2008) Regulation of beta-catenin by a novel nongenomic action of thyroid hormone beta receptor. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4598–4608
- 54 Furuya, F. *et al.* (2006) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by a mutant thyroid hormone beta receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1780–1785
- 55 Furuya, F. *et al.* (2007) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase delays tumor progression and blocks metastatic spread in a mouse model of thyroid cancer. *Carcinogenesis* 28, 2451–2458
- 56 Guigon, C.J. *et al.* (2009) PTEN deficiency accelerates tumour progression in a mouse model of thyroid cancer. *Oncogene* 28, 509–517
- 57 Furumoto, H. *et al.* (2005) An unliganded thyroid hormone beta receptor activates the cyclin D1/cyclin-dependent kinase/retinoblastoma/E2F pathway and induces pituitary tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 25, 124–135
- 58 Lu, C. *et al.* (2008) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling promotes aberrant pituitary growth in a mouse model of thyroid-stimulating hormone-secreting pituitary tumors. *Endocrinology* 149, 3339–3345
- 59 Ando, S. *et al.* (2001) Somatic mutation of TRbeta can cause a defect in negative regulation of TSH in a TSH-secreting pituitary tumor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5572–5576
- 60 Safer, J.D. *et al.* (2001) A pituitary tumor in a patient with thyroid hormone resistance: a diagnostic dilemma. *Thyroid* 11, 281–291
- 61 Hall, L.C. *et al.* (2008) Effects of thyroid hormones on human breast cancer cell proliferation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 109, 57–66
- 62 Rae, M.T. *et al.* (2007) Thyroid hormone signaling in human ovarian surface epithelial cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 322–327
- 63 Tsui, K.H. *et al.* (2008) Triiodothyronine modulates cell proliferation of human prostatic carcinoma cells by downregulation of the B-cell translocation gene 2. *Prostate* 68, 610–619
- 64 Plateroti, M. *et al.* (2006) Thyroid hormone receptor alpha1 directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3204–3214
- 65 Reddy, A. *et al.* (2007) Hypothyroidism: a possible risk factor for liver cancer in patients with no known underlying cause of liver disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 118–123
- 66 Beatson, G. (1896) On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet* 2, 104–107
- 67 Silva, J.M. *et al.* (2002) Expression of thyroid hormone receptor/erbA genes is altered in human breast cancer. *Oncogene* 21, 4307–4316
- 68 Cristofanilli, M. *et al.* (2005) Thyroid hormone and breast carcinoma. Primary hypothyroidism is associated with a reduced incidence of primary breast carcinoma. *Cancer* 103, 1122–1128
- 69 Hercbergs, A.A. *et al.* (2003) Propylthiouracil-induced chemical hypothyroidism with high-dose tamoxifen prolongs survival in recurrent high grade glioma: a phase I/II study. *Anticancer Res.* 23, 617–626



## REVIEW

# The growing role of gene methylation on endocrine function

Verónica García-Carpizo, Lidia Ruiz-Llorente, Mario Fraga<sup>1,2</sup> and Ana Aranda

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Autónoma de Madrid, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain

<sup>1</sup>Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC), Madrid, Spain

<sup>2</sup>Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

(Correspondence should be addressed to A Aranda; Email: aaranda@iib.uam.es)

## Abstract

DNA methylation is the best studied epigenetic factor, playing a key role in producing stable changes in gene expression, thus defining cell identity and function and adapting cells to environmental changes. DNA methylation has also been recently shown to mediate cell responses to physiological endocrine signals. Moreover, alterations of the normal DNA methylation pattern can also contribute to the development of endocrine and metabolic diseases and can explain the relationship between an individual's genetic background, the environment, and disease. It should be remarked that although DNA methylation and demethylation are active processes, epigenetic changes produced during development can impact adult processes, establishing the idea that endocrine function can be persistently affected by events occurring in early life. Given the complexity of the endocrine system, both genetic and epigenetic processes, including DNA methylation, must be involved in its proper development and functioning. In this study, we summarize the recent knowledge in the field of DNA methylation and endocrinology. Given that DNA methylation can be involved in a number of endocrine and metabolic disorders, understanding and manipulating this modification opens a new door for preventing and treating endocrine diseases.

*Journal of Molecular Endocrinology* (2011) **47**, R75–R89

## What is epigenetics?

The term ‘epigenetics’ has classically been used to explain phenotypic events that cannot be described by genetic mechanisms. Waddington (1942) coined the term ‘epigenetics’ in the 1940s, defining epigenetics as ‘the branch of biology that studies the causal interactions between genes and their products, which bring the phenotype into being’. An updated definition now considers epigenetic conditions to be those that affect gene expression without changing the nucleotide sequence, in a way that can involve mitotic, or, less frequently, meiotic inheritance (Holliday 2006), conferring a certain stability on epigenetic events through cell generations. Very recently, Skinner *et al.* (2010) have defined epigenetics as ‘molecular factors and processes around DNA that are mitotically stable and regulate genome activity independent of DNA sequence’. Although most of the cells in a multicellular organism share the same genetic information, an organism produces many different cell types during its development, each characterized by a typical gene expression profile and by specific functions. Consequently, cell differentiation might be considered as a

largely epigenetic phenomenon. The first epigenetic modification identified was DNA methylation in the 1970s (Holliday & Pugh 1975). However, epigenetics also addresses covalent modifications of histones and the mechanisms through which they alter chromatin structure (Turner 1998). Other gene regulation mechanisms such as non-coding RNA are also included among epigenetic pathways (Aguilera *et al.* 2010). Epigenetic processes are likely to be expanded in the future. For example, the recent identification of hydroxymethylcytosine residues is a new epigenetic mark whose function remains to be elucidated (Kriaucionis & Heintz 2009). In this review, we will focus on only one of these epigenetic modifications, namely DNA methylation.

## DNA methylation

DNA methylation is the most extensively investigated epigenetic modification because more than two decades ago it was shown to play a critical role in cancer. Feinberg & Vogelstein (1983) demonstrated for the first time that tumor cells can lose DNA methylation

at specific DNA regions. Subsequently, many laboratories identified a number of tumor suppressor genes that often become aberrantly hypermethylated and repressed in cancer cells (Feinberg 2007). Later on, investigations moved outside of the cancer field and today it is well established that DNA methylation is essential for normal development and differentiation in mammals (Fraga 2009). DNA methylation consists of the covalent addition of a methyl group at the 5-position of cytosines. This normally occurs on a cytosine followed by a guanine, called a CpG dinucleotide. This dinucleotide normally occurs at low frequency in vertebrate DNA. However, stretches of DNA with a high C+G content and a high frequency of CpG dinucleotides relative to the bulk genome have been defined as CpG islands by Gardiner-Garden & Frommer (1987). Most CpG dinucleotides are methylated, but those located in CpG islands are usually unmodified. Although CpG islands are located preferentially in gene promoters or regulatory regions, most of these dinucleotides are nonetheless found in repetitive DNA elements. The DNA methylation pattern is removed in the early embryo and then reconstituted at the time of implantation (Kafri *et al.* 1992). DNA methylation is also responsible for genomic imprinting, securing monoallelic gene expression by repressing expression of the paternal or maternal genes, for X-chromosome inactivation in females, and for silencing of parasitic elements (Payer & Lee 2008, Kacem & Feil 2009).

Although methylation of cytosine bases (mCs) in CpG dinucleotides is the principal form of DNA methylation, other modifications such as methylation of cytosine in CpNpG trinucleotides (where N denotes any base) or hydroxymethyl cytosines (hmCs) also exist, and all these modifications define the DNA methylome of a cell. A full methylome analysis should include these modifications in addition to mCG, although the biological function of mCGs and hmCs has not yet been clarified (Beck 2010). Methylome analysis, as well as the analysis of other epigenetic marks, will be needed to define the epigenome map characteristics of normal development and differentiation, including development of endocrine glands, and for the identification of genomic regions involved in endocrine and non-endocrine disorders. Another unresolved issue in DNA methylation is that of bisulfite sequencing, the currently used method of analysis that relies on the conversion of unmethylated cytosine residues to uracil cannot distinguish between methylation and hydroxymethylation, and densely hydroxymethylated regions of DNA may be underrepresented in quantitative methylation analyses (Huang *et al.* 2010). In 2009, the first genome-wide, single-base resolution maps of methylated cytosines in a mammalian genome have been resolved (Lister *et al.* 2009). Surprisingly, and in

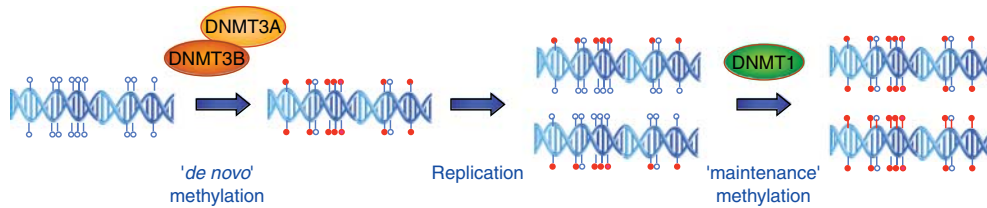
contrast with differentiated cells, a significant fraction (almost one-quarter) of the methylation found in embryonic stem cells occurred in a non-CG context. This modification was lost on induction of differentiation and was restored in induced stem cells. These interesting results provide a foundation for future studies exploring this key epigenetic modification in human disease and development and to analyze its role in endocrine function.

## DNA methyltransferases (DNMTs): hormonal control of DNMT expression

S-adenosylmethionine acts as a methyl donor for addition of the methyl group to cytosine residues within CpG dinucleotides. This reaction is catalyzed by DNA methyltransferase (DNMT) enzymes. In mammals, DNMTs include four members, in two families that are structurally and functionally distinct. The DNMT3 family establishes the initial CpG methylation pattern, whereas DNMT1 maintains this pattern during DNA replication (Mortusewicz *et al.* 2005, Chen & Li 2006). The DNMT3 family has three members: DNMT3A, DNMT3B, and DNMT3L (DNMT3 like). DNMT3L does not have enzymatic activity but may function as a regulator of DNA methylation. Inactivation of DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B by gene targeting was found to cause lethality in mice, either pre- or post-natally. DNMT3A and DNMT3B act basically as *de novo* methyltransferases establishing the DNA methylation patterns at early developmental stages, although they have also a function at later stages maintaining global DNA methylation levels. In contrast, DNMT1 lacks *de novo* methyltransferase activity but serves as a maintenance for methyltransferase by copying the DNA methylation pattern from the parental strand to the daughter strand after DNA replication (Robertson 2005; Fig. 1).

Recent results suggest that DNMT expression is under hormonal control. For instance, DNMT3A, DNMT3B, and DNMT1 are under the regulation of female sex steroid hormones during the menstrual cycle (Yamagata *et al.* 2009, van Kaam *et al.* 2011), and aberrant expression of DNMTs was observed in endometriosis (Wu *et al.* 2007, van Kaam *et al.* 2011). On the other hand, estradiol increases DNMT3A and DNMT3B expression in the dorsal hippocampus, and increased methylation of memory suppressor genes (e.g. reelin) may be crucial for estradiol to enhance memory consolidation (Zhao *et al.* 2010). Paradoxically, even though congenital hypothyroidism is associated with impaired cognitive development, increased methylation of the reelin and *BDNF* genes is also found in the hippocampus of hypothyroid rats (Sui & Li 2010), showing the complex effects of thyroid hormones in brain development.





**Figure 1** The DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are responsible for *de novo* methylation, whereas DNMT1 is in charge of maintaining methylation after DNA replication by modifying the daughter strand. The daughter strands of DNA following replication are unmethylated. Hemi-methylation status is recognized by DNMT1, which is recruited to the replication fork, and then restores the parental methylation pattern. Unmethylated CpGs are shown by empty circles and the methylated nucleotides by red circles.

Alterations in male reproductive tract development and postpubertal prostatitis observed after exposure to the antiandrogenic compound vinclozolin during gonadal sex determination could also be related to changes in DNMTs expression in the testis and prostate (Anway & Skinner 2008, Anway *et al.* 2008, Cowin *et al.* 2010). Furthermore, changes in DNMT1 expression have been shown to contribute to both prostate cancer initiation and promotion (Esteller 2005, Feinberg *et al.* 2006).

Peptide hormones can also regulate DNMT expression. For instance, autocrine human GH (hGH) increases expression of DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in mammary carcinoma cells and it has been postulated that the oncogenic effects of hGH in these cells is secondary to the increase in DNMTs that in turn causes silencing of the plakoglobin gene by hypermethylation of its promoter CpG island (Shafiei *et al.* 2008).

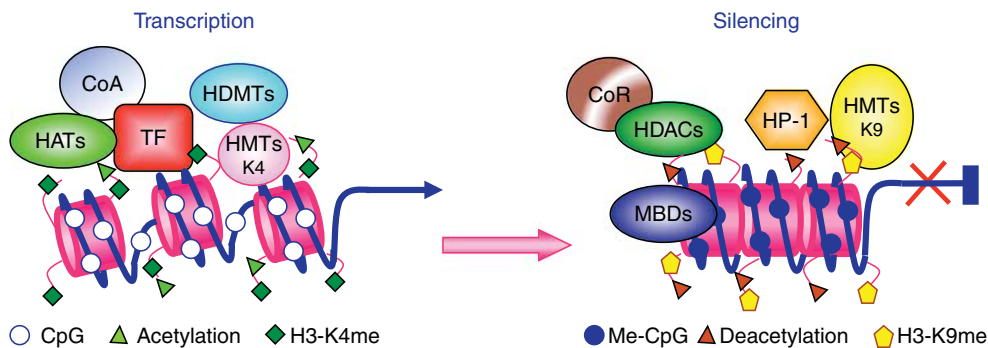
Although DNMT expression and function can be regulated by hormones, the cited studies show mostly correlative effects and the molecular mechanisms involved are still poorly understood.

## Gene repression by DNA methylation: link to histone modifications

In general, DNA methylation leads to repression of gene expression. Normally, methylated genes are either not transcribed into mRNA or transcribed at a markedly reduced rate (Esteller 2005, Feinberg *et al.* 2006). Cytosine methylation alters the structure of the major groove of DNA, and this can block the recruitment of transcription factors to their binding sites and inhibit gene transcription. However, although DNA methylation can affect association of several transcription factors (including E2F, MLTF, or CTCF) to their recognition sites, other transcription factors, such as Sp1, can still bind to methylated DNA. In addition to altering transcription factor binding, DNA methylation allows the recruitment of proteins with high affinity for methylated CpGs (methyl binding proteins or MBDs)

that can repress gene expression. Five MBDs have been identified (MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, and MBD4), and excluding MBD4, they induce transcriptional silencing (Bird & Wolffe 1999). Histone deacetylation is linked to chromatin compaction and transcriptional repression, and after binding to methylated CpG dinucleotides, the MBD MeCP2 interacts with corepressor complexes containing histone deacetylases (HDACs) and Sin3a inducing gene silencing (Jones *et al.* 1998, Nan *et al.* 1998). Interestingly, the same corepressor complexes are recruited to hormone nuclear receptors and mediate ligand-independent repression of gene expression by some unliganded non-steroid receptors and by antagonist-bound steroid receptors (Aranda & Pascual 2001). Other MBDs interact directly with DNMT1 and with one or more HDACs (Fuks *et al.* 2000, 2001, Robertson *et al.* 2000, Rountree *et al.* 2000, Aapola *et al.* 2002, Kimura & Shiota 2003), suggesting the existence of a functional cooperation between CpG methylation and histone deacetylation that silences gene expression in a stable manner.

The N-terminal tails of histones can undergo different posttranslational modifications that seem to have a crucial influence on chromatin structure and are linked to either transcriptional repression or activation (Kouzarides 2007). Whereas histone acetylation is normally associated with transcriptionally active chromatin, methylation of histone H3 at particular residues can lead to local formation of heterochromatin, which in contrast with DNA methylation that causes stable transcriptional repression is fully reversible. The existence of a cross talk between DNA methylation and histone modifications, which can be mediated by interactions between histone methyltransferases and DNMTs, has been recently demonstrated (Fig. 2). Relationships between DNA methylation and histone modification have implications for understanding normal development as well as somatic cell reprogramming and tumorigenesis (Cedar & Bergman 2009). Thus, histone deacetylation facilitates methylation of H3K9 by the histone methyltransferase G9a. Methylation of this residue facilitates the recruitment of the



**Figure 2** DNA methylation causes gene silencing. Transcriptionally active chromatin is characterized by unmethylated DNA and binding of transcription factors (TF) with recruitment of coactivators (CoA) and histone-modifying enzymes such as histone acetyltransferases (HATs), methyltransferases (HMTs), and demethylases (HDMTs), which induce among other modifications of histone acetylation and H3 di- or tri-methylation in lysine 4 (H3-K4me, a marker of active chromatin). CpG methylation (Me-CpG) silences gene expression by recruitment of methyl-binding proteins (MBDs), the heterochromatin protein HP-1, corepressor (CoR) complexes containing histone deacetylases (HDACs), and histone methyltransferases leading to deacetylation of the histone tails and methylation of H3 in lysine 9 (H3-K9me). These silencing complexes produce chromatin compaction. Many other epigenetic factors are also known to control gene transcription and silencing and therefore this figure illustrates only an example of regulation of gene expression.

heterochromatin protein 1 (HP1), allowing local heterochromatinization. The histone methyltransferase G9a also recruits DNMT3A and DNMT3B, inducing *de novo* DNA methylation, at the final step of silencing of pluripotency genes (Feldman *et al.* 2006). These functions of the histone methyltransferase-containing complexes appear to play an important role in post-implantation gene repression by DNA methylation and represent a basic example of the cross talk between DNA methylation and histone posttranslational modifications.

## DNA methylation and endocrine diseases

Epigenetic changes are not only responsible for normal development, but they are also involved in disease. Genetic lesions, including mutations, deletions, or breakages, are well known to produce disorders in humans, but there is increasing evidence that diseases can also be caused by epigenetic alterations. Changes in DNA methylation can cause silencing of normally active genes or activation of normally silent genes. This could occur in cancer, in hereditary disorders resulting from DNA methylation defects, and in late-onset diseases caused by the interaction of genomic, epigenetic, and environmental changes (Robertson 2005, Feinberg 2007).

The Beckwith–Wiedemann syndrome, an overgrowth disorder characterized by an increased risk of cancer and different malformations, is an example of a single-gene epigenetic disease. Some patients with Beckwith–Wiedemann syndrome show loss of imprinting of insulin-like growth factor 2 (IGF2), leading to an

increase in the levels of this growth factor (DeBaun *et al.* 2002). A human disorder with multiple hormone resistance, the pseudohypoparathyroidism type 1A (PHPIA), is also caused by tissue-specific differential imprinting of splice variants of the guanine nucleotide regulatory protein (encoded by GNAS1; Lalande 2001). Other class of monogenic diseases involves mutation of genes involved themselves in methylation machinery. For instance, Rett syndrome is caused by mutations that affect the methyl-CpG-binding protein MeCP2. Rett syndrome is a neurodevelopmental disorder that affects mainly females. Among other symptoms, affected patients can have seizures, present intellectual disability with learning difficulties, and have no verbal skills. This phenotype argues for the primacy of MeCP2, as opposed to other MBDs, in the silencing mechanism associated with DNA methylation, at least in the central nervous system. In Rett syndrome, DNA methylation is not altered, but gene silencing is abnormal because DNA methylation goes unrecognized (Bienvenu & Chelly 2006).

Gene hypomethylation is a common event in cancer, although site-specific hypermethylation and other epigenetic chromatin modifications are also found in tumors (Cedar & Bergman 2009). A large number of cancer-related genes that are silenced or activated by aberrantly methylated CpG islands have been identified in different types of tumors indicating that epigenetic events play a key role in tumorigenesis (Costello *et al.* 2000). Many growth-promoting genes are activated in tumors due to DNA hypomethylation and, not surprisingly, some major hypermethylated genes in cancer include tumor suppressors (Feinberg & Vogelstein 1983). In the case of an imprinted tumor suppressor

gene, hypermethylation of only one allele is sufficient to cause a total loss of its tumor suppressor function because the other allele is already inactive (Feinberg *et al.* 2006). On the contrary, loss of imprinting of an oncogene can lead to overexpression of the oncogenic protein and consequently to increased risk of tumor formation. Importantly, lymphocytes in ~10% of the human population have loss of imprinting at the IGF2 locus. Interestingly, the IGF2 receptor (IGFR2) gene that functions as a tumor suppressor is not imprinted in humans but is imprinted and has a maternal expression in mice. Therefore, it has been predicted that the incidence of tumors resulting from IGFR2 inactivation should be lower in humans than in mice (Jirtle & Skinner 2007).

DNA methylation of tumor suppressor genes is common in endocrine cancer. To give a few examples, epigenetic gene silencing of tumor suppressor genes, including E-cadherin, PTEN, RASSF1A, and FGFR2, and of differentiation-related genes, such as TSH receptor and the sodium-iodide symporter, has been reported in thyroid cancers (Kondo *et al.* 2006, 2007, Xing 2007). Frequent promoter hypermethylation of the APC, RASSF1A, or Rap1GAP tumor suppressors is found in parathyroid tumors (Juhlin *et al.* 2010). von Hippel–Lindau inactivation by promoter methylation is an important pathway for the development of malignant sporadic pancreatic endocrine tumors (Schmitt *et al.* 2009) and pheochromocytomas (Cascon *et al.* 2004), and loss of pRb and neuronatin expression is associated with promoter hypermethylation in pituitary adenomas (Simpson *et al.* 2000, Dudley *et al.* 2009, Revill *et al.* 2009).

The existence of hormone-independent tumors is a substantial problem for the treatment of several endocrine tumors with hormone antagonists. Hypermethylation can selectively silence multiple promoters of steroid receptors in hormone-dependent cancers, including ovarian, endometrial, breast, and prostate cancer. Aberrant DNA methylation of the promoter region of estrogen (ER), progesterone (PR), and androgen (AR) receptors can play an important role in the loss of hormone dependence, although resistance to hormonal treatment can appear even in the presence of steroid receptor expression (Lapidus *et al.* 1996, Jarrard *et al.* 1998, Sasaki *et al.* 2003, Asada *et al.* 2008). Interestingly, DNMT inhibitors such as 5-aza-2'-deoxycytidine and HDAC inhibitors such as trichostatin A have been successfully used to induce ER expression in ER-negative breast cancer cells (Ferguson *et al.* 1995) and to sensitize hormone-resistant ER-negative breast cancer cells to tamoxifen (Jang *et al.* 2004). It is increasingly recognized that epigenetic gene silencing plays a major role in tumor initiation and progression in hormone-dependent cancers. Indeed, in the first genome-wide DNA methylation profiling according to

the receptor status of breast cancer, it has been found that ER/PR status affects the global DNA methylation profile (Li *et al.* 2010).

Expression of other non-steroid hormone nuclear receptors has also been found to be inactivated by promoter DNA methylation in tumors. This is the case for the thyroid hormone receptor  $\beta$  isoform (TR $\beta$ ), which can function as a tumor suppressor (Martinez-Iglesias *et al.* 2009, Garcia-Silva *et al.* 2011). The TR $\beta$  promoter is methylated in early stage breast cancer tumors (Li *et al.* 2002). The same occurs with the retinoic acid receptor  $\beta$  (RAR $\beta$ ). Retinoic acid (RA), an active metabolite of vitamin A, plays a key role in development and has important antitransforming actions in many types of cancer cells. RAR $\beta$  is one of the tumor suppressor genes that are more often epigenetically inactivated in tumors (Esteller *et al.* 2002). Very recently, it has been found that RA plays a key role in the fate of intestinal cells through regulation of DNA demethylase activity (Rai *et al.* 2010). DNA demethylation has been proposed to involve the cooperative actions of proteins from the cytidine deaminase family (activation-induced deaminase and Apobec2), the G:T mismatch-specific glycosylase family (MBD4), and a DNA repair protein family (GADD45; Rai *et al.* 2008). However, the role of GADD45 in promoting DNA demethylation is still controversial (Jin *et al.* 2008) and DNA methylation is conserved in genetically modified mice lacking GADD45 (Engel *et al.* 2009). Loss of the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene is the key initiating step in a model of genetic and epigenetic events that lead to colorectal cancer. Loss of APC causes upregulation of a DNA demethylase system and the concomitant hypomethylation of key intestinal cell fating genes, whereas RA strongly downregulates demethylase components, thereby promoting DNA methylation of key genes and helping progenitor cells commit to differentiation (Rai *et al.* 2010).

## Hormonal control of DNA methylation/demethylation at target promoters

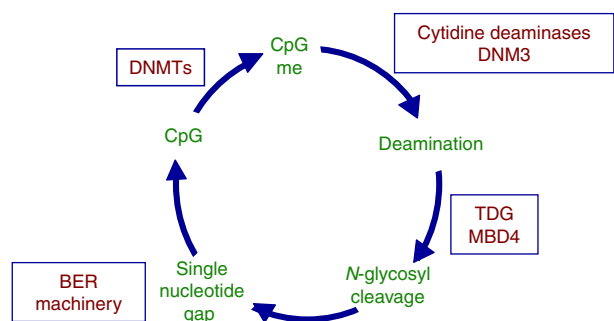
Although the mechanisms of DNA demethylation are not yet totally understood and remain a controversial issue (Ooi & Bestor 2008), recent data obtained studying the effect of hormones, mainly ligands of nuclear receptors, on transcription of their target genes indicate that they can mediate active DNA demethylation occurring independently of DNA replication. One of the first evidence was obtained with the glucocorticoid receptor (GR). Glucocorticoids cause local DNA demethylation of the tyrosine aminotransferase (*Tat*) gene around a glucocorticoid response element that is located 2.5 kb upstream of the



transcriptional start site. Kress *et al.* (2006), showed that demethylation is a consequence of an active mechanism that involves the creation of DNA nicks 3' to the methylcytosine and the participation of a demethylase initiating a base excision repair.

GR-dependent demethylation was slow since it was detected after a few hours of stimulation. However, a rapid methylation/demethylation at the ER target gene pS2 has been observed in breast cancer cells (Kangas-peska *et al.* 2008, Metivier *et al.* 2008). It had been previously shown that ER is recruited in a cyclic manner to the pS2 promoter and that this is followed by the assembly of coactivators, which in turn provokes local structural changes in chromatin. This allows the engagement of the basal transcription machinery and the activation of the RNA polymerase II, which is then followed by the recruitment of corepressor complexes and the initiation of the next transcriptional cycle (Metivier *et al.* 2003). Remarkably, these changes are accompanied by changes in the methylation of CpG dinucleotides in the pS2 promoter and breaks in the sugar–phosphate backbone of DNA. Cyclical methylation and demethylation of CpG dinucleotides had a periodicity of around 100 min, implying the existence of an active demethylation process. Methylation takes place at each transcriptional cycle after the occupancy of ER and polymerase II and is connected with the recruitment of MeCP2 and DNMT1 to the pS2 promoter. Recruitment of MBD2 and MBD3 occurs later, simultaneously with the recruitment of the remodeling complex NuRD. CpG methylation at the pS2 promoter is strand specific, occurring primarily in the transcribed strand. DNMTs appear to exhibit dual actions during these cycles, being involved in CpG methylation and also in active demethylation of 5mCpGs through deamination. As stated above, demethylation of the *Tat* gene involves the formation of DNA nicks, and CpG methylation/demethylation at the pS2 promoter also involves a base excision repair process with base substitution (Metivier *et al.* 2008). The following process has been suggested: deamination of 5mC by DNMT3A or DNMT3B would result in a T/G mismatch, which would be repaired by a thymine DNA glycosylase by excision of the mispaired cytosine, generating an abasic residue. This would be followed by the action of apurinic/aprimidinic endonuclease I, which would create a single nucleotide gap by cleaving the phosphodiester bond 5' to the excised base. Then, DNA polymerase  $\beta$  would replace the missing nucleotide and finally a DNA ligase would end the repairing process (Reid *et al.* 2009; Fig. 3).

Another example of rapid methylation/demethylation in a hormonally regulated promoter has been provided by the cytochrome p450 27B1 (CYP27B1), the final enzyme in vitamin D biosynthesis (Kim *et al.* 2009). CYP27B1 gene expression is regulated by two calcemic



**Figure 3** Proposed model for active DNA methylation/demethylation at steroid hormone target promoters. The process would involve deamination to thymidine resulting in T/G mismatch. The action of a thymine DNA glycosylase (TDG) such as MBD4 would initiate a process of repair that would be completed by the base excision repair (BER) machinery leading to unmethylated CpG, which can then be again methylated by DNMTs starting a new cycle.

hormones: parathyroid hormone (PTH) and vitamin D. PTH activates CYP27B1 transcription through stimulation of protein kinases A and C (PKA and PKC), whereas vitamin D through binding to its nuclear receptor, VDR, represses CYP27B1 transcription. A basic helix–loop–helix transcriptional activator (VDR-interacting repressor, VDIR) binds to the CYP27B1 promoter and VDR interacts with VDIR and represses transcription by means of recruiting a HDAC corepressor complex (Murayama *et al.* 2004). Reflecting vitamin-D-mediated transrepression of the CYP27B1 gene, rapid methylation of CpG sites is induced by vitamin D in this gene promoter. This methylation step requires DNMT1 and DNMT3B. Conversely, treatment with PTH causes active CpG demethylation of the CYP27B1 promoter. Purification of a VDIR-associated complex showed the presence of both DNMTs and the DNA glycosylase MBD4 in the complex. Activation of PKC by PTH causes MBD4 phosphorylation and activation. The DNA glycosylase would cause the excision of the mispaired nucleotide and a base excision repair process would achieve CpG demethylation of the promoter (Kim *et al.* 2009). Thus, the results obtained with the CYP27B1 promoter further suggest that DNA methylation/demethylation plays an important role in hormonal regulation of transcription.

Other member of the CYP superfamily, oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7B1), is also regulated by DNA methylation. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) represses liver expression of CYP7B1 in females but not in males. This inhibition appears to involve a sex-specific sumoylation of the receptor and is mediated by methylation of a Sp1 site in the CYP7B1 promoter, which contains a CpG dinucleotide. Methylation of this CpG inhibits binding of Sp1 to the promoter. Furthermore, complexes containing MBDs, NCoR,

HDACs, and histone methyltransferases are recruited to methylated DNA (Yoon *et al.* 2003), and it was found that these complexes are involved in inhibition of *CYP7B1* gene transcription by PPAR $\alpha$  (Leuenberger *et al.* 2009).

## DNA methylation and the persistent neonatal effects of glucocorticoids in the brain

Exposure to stress during neurodevelopment has an effect on the quality of physical and mental health. Maternal care might influence hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) function in the rat through epigenetic programming of GR expression (Weaver *et al.* 2007). In humans, childhood abuse alters HPA stress responses and increases the risk of suicide. Decreased levels of *GR* mRNA and increased methylation of the GR promoter were found in hippocampus from abused suicide victims that also showed a decrease in NGFI-A transcription factor binding. These findings translate previous results from rat to humans and suggest a common effect of parental care on the epigenetic regulation of hippocampal GR expression (McGowan *et al.* 2009). The most normally used technique to induce early life stress is periodic infant–mother separation during the neonatal period. This causes an irreversible increase in glucocorticoid secretion with disruption of the activity of the HPA axis and increased sensitivity to stress later in life, which are related to disorders of mood and cognition. Murgatroyd *et al.* (2009) have examined the expression of AVP and CRH in early life stress. These hypothalamic secretagogues regulate HPA axis activity by increasing ACTH expression. They found that neonatal stress induces lifelong hypomethylation of the *AVP* gene, causing increased AVP expression, activation of the HPA axis, and behavioral alterations. They found that hypomethylated CpG residues serve as DNA-binding sites for MeCP2 that is phosphorylated by CaMKII after depolarization of hypothalamic cells. Thus, this study defines this methyl CpG-binding protein as an important component in the epigenetic programming of neuroendocrine and behavioral functions.

There is evidence for hypercortisolemia playing a role in the generation of psychiatric symptoms and for epigenetic variation within HPA axis genes mediating behavioral changes also in the adult. When mice are treated with corticosterone, they exhibit anxiety-like behavior together with a significant decrease in the hippocampal mRNA levels of GR and an increase in the stress-related gene *Fkbp5*. This gene encodes a co-chaperone of hsp90 that binds to GR and promotes cytoplasmic localization of the receptor, regulating GR sensitivity. Differences were seen in *Fkbp5* methylation

in hippocampus and hypothalamus of glucocorticoid-treated animals. The same occurs in a mouse hippocampal neuronal cell line exposed to corticosterone. This suggests that DNA methylation plays a role in mediating effects of glucocorticoid exposure on FKBP5 function, with potential consequences for behavior (Lee *et al.* 2010).

Lower weight at birth is associated not only with risk of metabolic syndrome but also with cardiovascular disease and hypertension in adulthood (Stein *et al.* 1996, Heijmans *et al.* 2008). The renin–angiotensin system appears to play a role in this process since a maternal low-protein diet results in undermethylation of the *At1b* angiotensin receptor promoter and early overexpression of this gene in the adrenal of offspring (Bogdarina *et al.* 2007). Furthermore, maternal glucocorticoids modulate this effect on fetal DNA methylation since treatment of rat dams with the 11- $\beta$ -hydroxylase inhibitor metyrapone prevents the epigenetic change and hypertension in the offspring (Bogdarina *et al.* 2010). Collectively, these studies suggest that DNA methylation might have an important role on the long-term effects of glucocorticoids in neonatal brains. However, as the absolute changes are low and the cell-type composition was not always systematically analyzed, further studies are needed to determine the functional role of epigenetic factors in the long-term effects of early development.

The pro-opiomelanocortin (*POMC*) gene plays an important role not only in the regulation of the HPA axis and adrenal development but also in obesity. The *POMC* gene is activated in ACTH-dependent Cushing's syndrome. This disorder may be a consequence of activation of the highly tissue-specific *POMC* promoter in pituitary and non-pituitary sites. This promoter contains a CpG island, which is methylated in normal non-expressing tissues, but is specifically demethylated in expressing tissues and tumors (Newell-Price *et al.* 2001). Methylation near the response element for the tissue-specific *POMC* activator PTX1 abolishes binding of this transcription factor that plays a key role in pituitary development. It has been suggested that the *POMC* promoter could show different degree of methylation in *POMC*-expressing hypothalamic neurons, thus influencing food intake and obesity (Newell-Price 2003).

## DNA methylation and gonadal hormones in the developing brain

Many brain sex-specific features arise from effects of the gonadal steroid hormones, which are exerted during the perinatal period. Testosterone is converted into estradiol within developing neurons, and estradiol mediates several developmental sex differences in cell

anatomy and physiology. These differences are responsible for dimorphic regulation of pituitary gonadotropin secretion and for sex-specific behavior (McCarthy 2008). Alterations in DNA methylation of genes essential for sexual brain differentiation, including ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and the PR themselves, have been described to be sex and hormonally regulated. Methylation of the ER $\alpha$  promoter within the preoptic area, which is crucial for sexual behavior, is influenced by maternal care during the neonatal period in rodents. Thus, maternal licking and grooming has been demonstrated to alter ER $\alpha$  promoter methylation, and consequently ER $\alpha$  expression, in a sex-specific manner (Champagne *et al.* 2006). In addition, methylation of the ER $\alpha$  gene in the preoptic area is higher in newborn females than in males or estradiol-treated females, and sex and hormone-mediated differences in methylation were also observed at later stages (Kurian *et al.* 2010). While ER $\alpha$  activation is required for neonatal brain masculinization, ER $\beta$  activation appears to be involved in brain defeminization and in the regulation of neuroendocrine functions, since this receptor colocalizes with neuroendocrine hormones such as GnRH, CRH, oxytocin, vasopressin, or prolactin. CpG methylation of the ER $\beta$  gene in the preoptic area, hypothalamus, or hippocampus of newborns is not significantly influenced by sex or hormonal treatment. However, there are differences in ER $\beta$  methylation in these brain areas in the adult (Schwarz *et al.* 2010). On the other hand, whereas in hypothalamus of newborn animals no sex differences in PR promoter methylation are detected, significantly lower levels are found in adolescent females than males. It has been suggested that gonadal female hormones promote PR methylation in the hypothalamus, silencing PR expression during the critical period of sexual differentiation in the male, a process that is essential for masculine behavior in the adult.

Whereas DNA methylation can be profoundly influenced by gonadal hormones during brain development, the effect of these hormones in the adult brain has received less attention. However, it has been recently reported that testosterone regulates expression of vasopressin (AVP) within the bed nucleus of the stria terminalis (BST) in the adult brain. Castration of male rats strongly inhibits AVP expression in this nucleus, and this inhibition is reversed on testosterone treatment. It was found that castration results in AVP promoter methylation at specific CpG sites in the BST. Conversely, castration significantly increased ER $\alpha$  mRNA levels by decreasing ER $\alpha$  promoter methylation. These results suggest that the DNA methylation pattern of some steroid responsive genes is actively regulated by gonadal steroid hormones in the adult brain. It is intriguing the opposite regulation of ER $\alpha$  and AVP promoter methylation in response to changes in steroid

hormone levels in the same brain region, and how this specificity is regulated remains to be elucidated. In any case, these results indicate that regulation of DNA methylation in the adult brain could play a role in the hormonal control of behavior (Auger *et al.* 2011).

## Endocrine disruptors and their possible transgenerational effects

Epigenetic factors can be altered by the environment (Fraga *et al.* 2005, Baryshnikova *et al.* 2008, Stidley *et al.* 2010), and increasing evidence suggests that a large variety of environmental and dietary chemicals can interfere with normal endocrine functions and result in adverse consequences. Initial animal studies demonstrated that compounds with estrogenic activity can disrupt reproductive tract function. However, it is now evident that different chemical compounds, referred to as 'endocrine disruptors', can either mimic or interfere with the normal actions of hormones including not only sexual steroids, but also thyroid, hypothalamic, and pituitary hormones (Newbold *et al.* 2006). The effect of endocrine disruptors is particularly strong when exposure occurs during fetal or neonatal periods. If exposure occurs during these critical stages, it can produce permanent effects that may be observed much later in life. For instance, exposure of newborn mice to environmental estrogens causes uterine lesions and uterine tumors in adults. Mechanistic studies provided support that estrogens cause both genetic and epigenetic alterations in developing target tissues. Thus, the estrogen-responsive genes lactoferrin and c-fos are permanently upregulated in the uterus after developmental exposure to the estrogen-like compound diethylstilbestrol (DES) due to hypomethylation of the promoter region of these genes after exposure to this chemical (Li *et al.* 1997, 2003). DES was prescribed during many years to pregnant women to prevent spontaneous abortions. More recently, Tang *et al.* (2008) identified 14 genes whose methylation patterns are altered after neonatal treatment with DES or genistein (other estrogenic compound), among them the gene encoding the nucleosomal binding protein 1 (NSBP1), a nucleosome core particle binding protein that plays a role in chromatin remodeling. On the other hand, bisphenol-A is a non-steroidal estrogen that is ubiquitous in the environment. Bromer *et al.* (2010) have recently demonstrated that methylation of the *Hoxa10* gene was decreased in the reproductive tract of mice exposed *in utero* to bisphenol-A. Decreased DNA methylation led to an increase in binding of ER $\alpha$  to the *Hoxa10* promoter and to increased estrogen-dependent transcription. Permanent epigenetic alteration of sensitivity to estrogen may then be a mechanism through which endocrine disruptors exert their action.

The demonstration that many estrogenic compounds show lifelong effects in animals has raised the concern that fetal and neonatal exposure to these compounds in humans could also produce epigenetic changes and impact negatively human health. For instance, human fetuses can be exposed to high estrogen levels, due to unintentional continuation of birth control pill intake by the mother before detection of pregnancy. On the other hand, exposure of the mother to environmental estrogen disruptors or intake of high levels of phytoestrogens can affect the fetus and even the infant during breastfeeding, with possible adverse consequences (Prins 2008).

Although epigenetic transgenerational inheritance is a controversial issue at the moment, results obtained with experimental animals have suggested that adverse effects caused by endocrine disruptors may be transmitted to subsequent generations. Environmental factors may induce epigenetic changes in the germ line, which would be passed to the progeny (Jirtle & Skinner 2007). In agreement with this hypothesis, the susceptibility for tumors after treatment with DES was transmitted to the descendants through the maternal germ cell lineage (Newbold *et al.* 1998), and prenatal exposure to the endocrine disruptors vinclozolin (an antiandrogenic compound) or methoxychlor (an estrogenic compound) induced an adult phenotype in the F<sub>1</sub> generation of decreased spermatogenic capacity and increased incidence of male infertility. Furthermore, these effects were described to be transferred through the male germ line to nearly all males of several generations (Anway *et al.* 2005). However, the transgenerational effects have not been reproduced by other groups (Renner 2009), casting some doubts on the transmission of the effects of vinclozolin beyond the F<sub>1</sub> generation. In contrast, a recent study has examined genome-wide promoter DNA methylation alterations in the sperm of F<sub>3</sub> generation rats whose F<sub>0</sub> generation mother was exposed to vinclozolin (Guerrero-Bosagna *et al.* 2010). This study has identified 52 different regions with altered methylation in the sperm promoter epigenome, suggesting again that an endocrine disruptor could have the ability to induce epigenetic transgenerational changes. As the DNA methylation differences reported in this study are very marginal, further investigations are needed to fully characterize the putative heritability of epigenetic factors.

## Type 2 diabetes, metabolism, and DNA methylation

Insulin plays a key role in metabolic control, and therefore, regulation of insulin gene expression has been extensively analyzed. However, only recently it has

been shown that the insulin promoter is demethylated specifically in pancreatic  $\beta$  cells both in humans and in mice. The insulin gene is methylated in mouse embryonic stem cells and becomes demethylated on differentiation into insulin-expressing cells. Methylation of a specific CpG located in a cAMP response element (CRE) of the insulin promoter inhibits association of the transcription factors CREB and ATF2 that bind to the CRE, while inducing MeCP2 recruitment, leading to a strong reduction of promoter activity (Kuroda *et al.* 2009). Therefore, promoter demethylation may play an important role in the specific expression of the insulin gene in pancreatic  $\beta$  cells.

Abnormal nutrition during embryonic development has been shown to influence disease susceptibility in the descendants. The global prevalence of obesity and type 2 diabetes is increasing, and parent obesity is a risk factor for developing obesity in childhood (Whitaker *et al.* 1997). In rodents, it has been shown that when mothers are fed with a high-fat diet (HFD), male offspring exhibit increased body weight and are diabetic and insulin resistant. Furthermore, the offspring of these males also present insulin resistance, showing that fathers can start intergenerational inheritance of metabolic diseases (Dunn & Bale 2009). Accordingly, paternal HFD alters gene expression in pancreatic  $\beta$  cells of adult female offspring. The *I13ra2* gene, a gene belonging to the Jak-Stat signaling pathway, presented the highest difference in gene expression. An epigenetic mechanism appears to contribute to the altered *I13ra2* expression, since methylation at CpG -960 of *I13ra2* was significantly reduced in HFD offspring with respect to controls. This CpG is located in a putative recognition site for the transcription factor TCF-1A and for the methylated DNA binding protein NF-X. These results show that paternal HFD could affect metabolism of the offspring by epigenetic regulation of genes important for pancreatic  $\beta$  cell function (Ng *et al.* 2010).

Offspring of males fed a low-protein diet also exhibit metabolic disturbances. Epigenomic profiling of offspring livers reveals changes in cytosine methylation depending on paternal diet, including reproducible changes in DNA methylation of PPAR $\alpha$ , a key lipid regulator. These results indicate that parental diet can affect cholesterol and lipid metabolism in offspring and define a model system to study environmental reprogramming of the heritable epigenome (Carone *et al.* 2010).

Intrauterine growth restriction (IUGR) also increases susceptibility to age-related diseases, including type 2 diabetes. In a rodent model of IUGR, which develops diabetes in adulthood, global decreases in DNA methylation concomitant with a decrease in DNMT1, MeCP2, and HDAC1 is observed in tissues such as liver



or brain (Lillycrop 2011). Furthermore, it was found that expression of PDX1, a pancreatic and duodenal homeobox 1 transcription factor critical for  $\beta$  cell function and development, was permanently reduced in IUGR  $\beta$  cells and underwent epigenetic modifications: throughout development, there were epigenetic histone modifications, but after the onset of

diabetes in adulthood, the CpG island in the proximal *Pdx1* promoter was methylated, resulting in permanent silencing of the *Pdx1* locus (Park *et al.* 2008). Thompson *et al.* (2010) have generated the first DNA methylation map at almost 1 million unique sites throughout the rat genome in normal pancreatic islet cells, allowing the identification of the changes that

**Table 1** Examples of endocrine conditions associated with DNA methylation changes

Endocrine condition	Alteration	References
Beckwith–Wiedemann PHPIA Endocrine cancers	Loss of imprinting of IGF2 Differential imprinting of GNAS1 Methylation of tumor suppressor genes	DeBaun <i>et al.</i> (2002) Lalande (2001) Cascon <i>et al.</i> (2004), Kondo <i>et al.</i> (2006, 2007), Xing (2007) and Juhlin <i>et al.</i> (2010) Esteller <i>et al.</i> (2002), Li <i>et al.</i> (2002) and Asada <i>et al.</i> (2008) Rai <i>et al.</i> (2010) Ng <i>et al.</i> (2010)
Type 2 diabetes	Aberrant promoter methylation of ER $\alpha$ , PR, AR, TR $\beta$ , and RAR $\beta$  Regulation of DNA demethylase activity in intestinal cancer Paternal high-fat diet decreases <i>Il13ra2</i> promoter methylation in pancreatic $\beta$ cells of the offspring Paternal low-protein diet alters PPAR $\alpha$ methylation in livers of the offspring Intrauterine growth restriction decreases globally DNA methylation as well as DNMT1 and MeCP2 expression Permanent methylation of the <i>Pdx1</i> gene in $\beta$ cells after intrauterine growth restriction Intrauterine growth restriction causes changes in DNA methylation in the proximity of genes with important roles in $\beta$ cell function and development	Carone <i>et al.</i> (2010)  Lillycrop (2011)  Park <i>et al.</i> (2008)  Thompson <i>et al.</i> (2010)
Neuroendocrine disorders of mood and cognition	HNF4 $\alpha$ methylation in offspring of malnourished mothers PPAR $\gamma$ C1 $\alpha$ methylation after overfeeding Maternal care affects brain GR methylation in rodents GR methylation in childhood abuse victims AVP hypomethylation and upregulation of HPA axis after infant–mother separation Glucocorticoids decrease GR expression and reduces methylation of the anxiety-related gene <i>Fkbp5</i>	Sandovici <i>et al.</i> (2011) Brons <i>et al.</i> (2010) Weaver <i>et al.</i> (2007) McGowan <i>et al.</i> (2009) Murgatroyd <i>et al.</i> (2009)  Lee <i>et al.</i> (2010)
Cardiovascular disease and hypertension in adulthood	Maternal low-protein diet induces undermethylation of At1b angiotensin receptor promoter in the adrenal of the offspring Glucocorticoid administration prevents At1b methylation and hypertension in the offspring	Bogdarina <i>et al.</i> (2007) Bogdarina <i>et al.</i> (2010)
Cushing's syndrome	Demethylation of the POMC promoter in non-pituitary cells and tumors	Newell-Price (2003)
Sexual hormones and the brain	Maternal care alters ER $\alpha$ promoter methylation in the preoptic area of the brain and sexual behavior Higher ER $\alpha$ methylation in the preoptic area of females Sexual differences in ER $\beta$ methylation in various brain areas Castration of male rats causes methylation of the AVP promoter and reduces ER $\alpha$ methylation in the bed nuclei of the stria terminalis Increased methylation of the memory suppressor gene reelin by estradiol	Champagne <i>et al.</i> (2006)  Kurian <i>et al.</i> (2010) Schwarz <i>et al.</i> (2010) Auger <i>et al.</i> (2011)  Zhao <i>et al.</i> (2010)
Endocrine disruptors	Hypomethylation of estrogen-responsive genes in the uterus after treatment with DES Changes in <i>NSBP1</i> promoter methylation after neonatal treatment with DES or genistein Undermethylation of the <i>Hoxa10</i> gene in the reproductive tract of mice exposed <i>in utero</i> to bisphenol-A Increased expression of DNMT3A and DNMT3L in testis and prostate of rats exposed to vinclozolin during gonadal sex determination Altered methylation pattern in 52 regions of the sperm in descendants of rats exposed to vinclozolin	Lee <i>et al.</i> (2003) Tang <i>et al.</i> (2008) Bromer <i>et al.</i> (2010) Anway <i>et al.</i> (2008) and Cowin <i>et al.</i> (2010) Guerrero-Bosagna <i>et al.</i> (2010)

occur as a consequence of IUGR. Comparison of growth restricted with normal rats revealed changes in DNA methylation at a number of novel loci, not limited to canonical CpG islands or promoters. The specific loci affected are in proximity to genes with important roles in  $\beta$  cell function and development, suggesting that that epigenetic dysregulation is a strong candidate for propagating the cellular memory of intrauterine events, causing changes in expression of nearby genes and long-term susceptibility to type 2 diabetes.

Low birth weight and unhealthy diets are also risk factors for metabolic disease including type 2 diabetes. Genetic, non-genetic, and epigenetic data propose a role of the key metabolic regulator PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PPAR $\gamma$ C1 $\alpha$ ) in the development of type 2 diabetes. When challenged with high-fat overfeeding, low birth weight subjects develop insulin resistance and reduced PPAR $\gamma$ C1 $\alpha$  and *OXPLOS* gene expression. PPAR $\gamma$ C1 $\alpha$  methylation was significantly higher in low birth weight subjects during the control diet. However, PPAR $\gamma$ C1 $\alpha$  methylation increased in only normal birth weight subjects after overfeeding. These changes are reversible, supporting that DNA methylation induced by overfeeding is reversible in humans (Brons *et al.* 2010). Moreover, in a very recent study, it has been shown that the increased risk of type 2 diabetes in the offspring of malnourished mothers was associated with the decreased expression of the orphan nuclear receptor HNF4 $\alpha$ , previously linked with this type of diabetes. Specifically, a pancreas-specific enhancer of HNF4 $\alpha$  expression is epigenetically inactivated by DNA methylation in the adult offspring of poorly nourished mothers, revealing a novel mechanism by which maternal diet and aging interact through epigenetic processes to determine the risk of age-associated endocrine diseases (Sandovici *et al.* 2011).

## Conclusions and perspectives

Epigenetic mechanisms may play a key role in normal endocrine physiology, as well as in the development of endocrine diseases. A summary of the changes in DNA methylation observed to date in relation to different endocrine conditions is illustrated in Table 1. A better knowledge of the association between epigenetic mechanisms and endocrine function should lead to a better understanding of the molecular basis of endocrine disorders and could help to the development of novel therapeutic strategies. DNA methylation acts at many levels to regulate hormonal actions: during development, in response to environmental factors and endocrine disruptors, in endocrine cancer, endocrine therapies, etc. Although many aspects of endocrine system epigenetics are still unknown, the recent advances described here shed a new light on the

importance of this epigenetic modification in the functioning of the endocrine glands and on the response of target tissues to hormones. The recent development of ultra-high-throughput technologies will allow the description of the whole genome DNA modifications that occur in endocrine physiology and pathology. These data hold the potential of defining the epigenetic signatures associated with endocrine disorders for future use as diagnostic markers and can lead to the development of novel epigenetic drugs with therapeutic applications in specific endocrinological diseases.

## Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of this review.

## Funding

The laboratory of A A is supported by Grants BFU2007-62402 from Ministerio de Ciencia e Innovación, RD06/0020/0036 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias and by the European Grant CRES-CENDO (FP-018652). The Cancer Epigenetics Unit at the IUOPA is supported by grants from the Spanish Ministry of Health (PS09/02454) and the Community of Asturias (FICYT IB09-106). The IUOPA is supported by the Obra Social Cajastur, Spain.

## References

- Aapola U, Liiv I & Peterson P 2002 Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Research* **30** 3602–3608. (doi:10.1093/nar/gkf474)
- Aguilera O, Fernandez AF, Munoz A & Fraga MF 2010 Epigenetics and environment: a complex relationship. *Journal of Applied Physiology* **109** 243–251. (doi:10.1152/jappphysiol.00068.2010)
- Anway MD & Skinner MK 2008 Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the prostate transcriptome and adult onset disease. *Prostate* **68** 517–529. (doi:10.1002/pros.20724)
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M & Skinner MK 2005 Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* **308** 1466–1469. (doi:10.1126/science.1108190)
- Anway MD, Rekow SS & Skinner MK 2008 Transgenerational epigenetic programming of the embryonic testis transcriptome. *Genomics* **91** 30–40. (doi:10.1016/j.ygeno.2007.10.002)
- Aranda A & Pascual A 2001 Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews* **81** 1269–1304.
- Asada H, Yamagata Y, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H, Hattori N, Ohgane J, Shiota K & Sugino N 2008 Potential link between estrogen receptor- $\alpha$  gene hypomethylation and uterine fibroid formation. *Molecular Human Reproduction* **14** 539–545. (doi:10.1093/molehr/gan045)
- Auger CJ, Coss D, Auger AP & Forbes-Lorman RM 2011 Epigenetic control of vasopressin expression is maintained by steroid hormones in the adult male rat brain. *PNAS* **108** 4242–4247. (doi:10.1073/pnas.1100314108)
- Baryshnikova E, Destro A, Infante MV, Cavuto S, Cariboni U, Alloisio M, Ceresoli GL, Lutman R, Brambilla G, Chiesa G *et al.* 2008

- Molecular alterations in spontaneous sputum of cancer-free heavy smokers: results from a large screening program. *Clinical Cancer Research* **14** 1913–1919. (doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1741)
- Beck S 2010 Taking the measure of the methylome. *Nature Biotechnology* **28** 1026–1028. (doi:10.1038/nbt1010-1026)
- Bienvenu T & Chelly J 2006 Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nature Reviews. Genetics* **7** 415–426. (doi:10.1038/nrg1878)
- Bird AP & Wolffe AP 1999 Methylation-induced repression – belts, braces, and chromatin. *Cell* **99** 451–454. (doi:10.1016/S0092-8674(00)81532-9)
- Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP & Clark AJ 2007 Epigenetic modification of the renin–angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circulation Research* **100** 520–526. (doi:10.1161/01.RES.0000258855.60637.58)
- Bogdarina I, Haase A, Langley-Evans S & Clark AJ 2010 Glucocorticoid effects on the programming of AT1b angiotensin receptor gene methylation and expression in the rat. *PLoS ONE* **5** e9237. (doi:10.1371/journal.pone.0009237)
- Bromer JG, Zhou Y, Taylor MB, Doherty L & Taylor HS 2010 Bisphenol-A exposure *in utero* leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *FASEB Journal* **24** 2273–2280. (doi:10.1096/fj.09-140533)
- Brons C, Jacobsen S, Nilsson E, Ronn T, Jensen CB, Storgaard H, Poulsen P, Groop L, Ling C, Astrup A *et al.* 2010 Deoxyribonucleic acid methylation and gene expression of PPARGC1A in human muscle is influenced by high-fat overfeeding in a birth-weight-dependent manner. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **95** 3048–3056. (doi:10.1210/jc.2009-2413)
- Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore PD *et al.* 2010 Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* **143** 1084–1096. (doi:10.1016/j.cell.2010.12.008)
- Cascon A, Ruiz-Llorente S, Fraga MF, Leton R, Telleria D, Sastre J, Diez JJ, Martinez Diaz-Guerra G, Diaz Perez JA, Benitez J *et al.* 2004 Genetic and epigenetic profile of sporadic pheochromocytomas. *Journal of Medical Genetics* **41** e3. (doi:10.1136/jmg.2003.012658)
- Cedar H & Bergman Y 2009 Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews. Genetics* **10** 295–304. (doi:10.1038/nrg2540)
- Champagne FA, Weaver IC, Diorio J, Dymov S, Szyf M & Meaney MJ 2006 Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor- $\alpha$ 1b promoter and estrogen receptor- $\alpha$  expression in the medial preoptic area of female offspring. *Endocrinology* **147** 2909–2915. (doi:10.1210/en.2005-1119)
- Chen T & Li E 2006 Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **301** 179–201. (doi:10.1007/3-540-31390-7\_6)
- Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC *et al.* 2000 Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nature Genetics* **24** 132–138. (doi:10.1038/72785)
- Cowin PA, Gold E, Aleksova J, O'Bryan MK, Foster PM, Scott HS & Risbridger GP 2010 Vinclozolin exposure *in utero* induces postpubertal prostatitis and reduces sperm production via a reversible hormone-regulated mechanism. *Endocrinology* **151** 783–792. (doi:10.1210/en.2009-0982)
- DeBaun MR, Niemitz EL, McNeil DE, Brandenburg SA, Lee MP & Feinberg AP 2002 Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith–Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. *American Journal of Human Genetics* **70** 604–611. (doi:10.1086/338934)
- Dudley KJ, Revill K, Clayton RN & Farrell WE 2009 Pituitary tumours: all silent on the epigenetics front. *Journal of Molecular Endocrinology* **42** 461–468. (doi:10.1677/JME-09-0009)
- Dunn GA & Bale TL 2009 Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. *Endocrinology* **150** 4999–5009. (doi:10.1210/en.2009-0500)
- Engel N, Tront JS, Erinle T, Nguyen N, Latham KE, Sapienza C, Hoffman B & Liebermann DA 2009 Conserved DNA methylation in Gadd45a (–/–) mice. *Epigenetics* **4** 98–99. (doi:10.4161/epi.4.2.7858)
- Esteller M 2005 Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **45** 629–656. (doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095832)
- Esteller M, Fraga MF, Paz MF, Campo E, Colomer D, Novo FJ, Calasanz MJ, Galm O, Guo M, Benitez J *et al.* 2002 Cancer epigenetics and methylation. *Science* **297** 1807–1808 (discussion 1807–1808). (doi:10.1126/science.297.5588.1807d)
- Feinberg AP 2007 Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* **447** 433–440. (doi:10.1038/nature05919)
- Feinberg AP & Vogelstein B 1983 Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301** 89–92. (doi:10.1038/301089a0)
- Feinberg AP, Ohlsson R & Henikoff S 2006 The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews. Genetics* **7** 21–33. (doi:10.1038/nrg1748)
- Feldman N, Gerson A, Fang J, Li E, Zhang Y, Shinkai Y, Cedar H & Bergman Y 2006 G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nature Cell Biology* **8** 188–194. (doi:10.1038/ncb1353)
- Ferguson AT, Lapidus RG, Baylin SB & Davidson NE 1995 Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression. *Cancer Research* **55** 2279–2283.
- Fraga MF 2009 Genetic and epigenetic regulation of aging. *Current Opinion in Immunology* **21** 446–453. (doi:10.1016/j.coi.2009.04.003)
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J *et al.* 2005 Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *PNAS* **102** 10604–10609. (doi:10.1073/pnas.0500398102)
- Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L & Kouzarides T 2000 DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature Genetics* **24** 88–91. (doi:10.1038/71750)
- Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M & Kouzarides T 2001 Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO Journal* **20** 2536–2544. (doi:10.1093/emboj/20.10.2536)
- Garcia-Silva S, Martinez-Iglesias O, Ruiz-Llorente L & Aranda A 2011 Thyroid hormone receptor beta1 domains responsible for the antagonism with the ras oncogene: role of corepressors. *Oncogene* **30** 854–864. (doi:10.1038/onc.2010.464)
- Gardiner-Garden M & Frommer M 1987 CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology* **196** 261–282. (doi:10.1016/0022-2836(87)90689-9)
- Guerrero-Bosagna C, Settles M, Lucker B & Skinner MK 2010 Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on promoter regions of the sperm epigenome. *PLoS ONE* **5** e13100. (doi:10.1371/journal.pone.0013100)
- Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE & Lumey LH 2008 Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *PNAS* **105** 17046–17049. (doi:10.1073/pnas.0806560105)
- Holliday R 2006 Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* **1** 76–80. (doi:10.4161/epi.1.2.2762)
- Holliday R & Pugh JE 1975 DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187** 226–232. (doi:10.1126/science.1111098)
- Huang Y, Pastor WA, Shen Y, Tahiliani M, Liu DR & Rao A 2010 The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS ONE* **5** e8888. (doi:10.1371/journal.pone.0008888)
- Jang ER, Lim SJ, Lee ES, Jeong G, Kim TY, Bang YJ & Lee JS 2004 The histone deacetylase inhibitor trichostatin A sensitizes estrogen receptor alpha-negative breast cancer cells to tamoxifen. *Oncogene* **23** 1724–1736. (doi:10.1038/sj.onc.1207315)

- Jarrard DF, Kinoshita H, Shi Y, Sandefur C, Hoff D, Meisner LF, Chang C, Herman JC, Isaacs WB & Nassif N 1998 Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Research* **58** 5310–5314.
- Jin SG, Guo C & Pfeifer GP 2008 GADD45A does not promote DNA demethylation. *PLoS Genetics* **4** e1000013. (doi:10.1371/journal.pgen.1000013)
- Jirtle RL & Skinner MK 2007 Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews. Genetics* **8** 253–262. (doi:10.1038/nrg2045)
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J & Wolffe AP 1998 Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics* **19** 187–191. (doi:10.1038/561)
- Juhlin CC, Kiss NB, Villablanca A, Haglund F, Nordenstrom J, Hoog A & Larsson C 2010 Frequent promoter hypermethylation of the APC and RASSF1A tumour suppressors in parathyroid tumours. *PLoS ONE* **5** e9472. (doi:10.1371/journal.pone.0009472)
- van Kaam KJ, Delvoux B, Romano A, D'Hooghe T, Dunselman GA & Strouboulis PG 2011 Deoxyribonucleic acid methyltransferases and methyl-CpG-binding domain proteins in human endometrium and endometriosis. *Fertility and Sterility* **95** 1421–1427. (doi:10.1016/j.fertnstert.2011.01.031)
- Kacem S & Feil R 2009 Chromatin mechanisms in genomic imprinting. *Mammalian Genome* **20** 544–556. (doi:10.1007/s00335-009-9223-4)
- Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H & Razin A 1992 Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes and Development* **6** 705–714. (doi:10.1101/gad.6.5.705)
- Kangaspekka S, Stride B, Metivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP, Benes V, Gannon F & Reid G 2008 Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* **452** 112–115. (doi:10.1038/nature06640)
- Kim MS, Kondo T, Takada I, Youn MY, Yamamoto Y, Takahashi S, Matsumoto T, Fujiyama S, Shirode Y, Yamaoka I *et al.* 2009 DNA demethylation in hormone-induced transcriptional derepression. *Nature* **461** 1007–1012. (doi:10.1038/nature08456)
- Kimura H & Shiota K 2003 Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1. *Journal of Biological Chemistry* **278** 4806–4812. (doi:10.1074/jbc.M209923200)
- Kondo T, Ezzat S & Asa SL 2006 Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nature Reviews. Cancer* **6** 292–306. (doi:10.1038/nrc1836)
- Kondo T, Zheng L, Liu W, Kurebayashi J, Asa SL & Ezzat S 2007 Epigenetically controlled fibroblast growth factor receptor 2 signaling imposes on the RAS/BRAF/mitogen-activated protein kinase pathway to modulate thyroid cancer progression. *Cancer Research* **67** 5461–5470. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4477)
- Kouzarides T 2007 Chromatin modifications and their function. *Cell* **128** 693–705. (doi:10.1016/j.cell.2007.02.005)
- Kress C, Thomassin H & Grange T 2006 Active cytosine demethylation triggered by a nuclear receptor involves DNA strand breaks. *PNAS* **103** 11112–11117. (doi:10.1073/pnas.0601793103)
- Kriaucionis S & Heintz N 2009 The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* **324** 929–930. (doi:10.1126/science.1169786)
- Kurian JR, Olesen KM & Auger AP 2010 Sex differences in epigenetic regulation of the estrogen receptor- $\alpha$  promoter within the developing preoptic area. *Endocrinology* **151** 2297–2305. (doi:10.1210/en.2009-0649)
- Kuroda A, Rauch TA, Todorov I, Ku HT, Al-Abdullah IH, Kandeel F, Mullen Y, Pfeifer GP & Ferreri K 2009 Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PLoS ONE* **4** e6953. (doi:10.1371/journal.pone.0006953)
- Lalande M 2001 Imprints of disease at GNAS1. *Journal of Clinical Investigation* **107** 793–794. (doi:10.1172/JCI2645)
- Lapidus RG, Ferguson AT, Ottaviano YL, Parl FF, Smith HS, Weitzman SA, Baylin SB, Issa JP & Davidson NE 1996 Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. *Clinical Cancer Research* **2** 805–810.
- Lee Y, Jin Y, Lim W, Ji S, Choi S, Jang S & Lee S 2003 A ginsenoside-Rh1, a component of ginseng saponin, activates estrogen receptor in human breast cancer carcinoma MCF-7 cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **84** 463–468. (doi:10.1016/S0960-0760(03)00067-0)
- Lee RS, Tamashiro KL, Yang X, Purcell RH, Harvey A, Willour VL, Huo Y, Rongione M, Wand GS & Potash JB 2010 Chronic corticosterone exposure increases expression and decreases deoxyribonucleic acid methylation of Fkbp5 in mice. *Endocrinology* **151** 4332–4343. (doi:10.1210/en.2010-0225)
- Leuenberger N, Praderwand S & Wahli W 2009 Sumoylated PPAR $\alpha$  mediates sex-specific gene repression and protects the liver from estrogen-induced toxicity in mice. *Journal of Clinical Investigation* **119** 3138–3148. (doi:10.1172/JCI39019)
- Li S, Washburn KA, Moore R, Uno T, Teng C, Newbold RR, McLachlan JA & Negishi M 1997 Developmental exposure to diethylstilbestrol elicits demethylation of estrogen-responsive lactoferrin gene in mouse uterus. *Cancer Research* **57** 4356–4359.
- Li Z, Meng ZH, Chandrasekaran R, Kuo WL, Collins CC, Gray JW & Dairkee SH 2002 Biallelic inactivation of the thyroid hormone receptor beta1 gene in early stage breast cancer. *Cancer Research* **62** 1939–1943.
- Li S, Hansman R, Newbold R, Davis B, McLachlan JA & Barrett JC 2003 Neonatal diethylstilbestrol exposure induces persistent elevation of c-fos expression and hypomethylation in its exon-4 in mouse uterus. *Molecular Carcinogenesis* **38** 78–84. (doi:10.1002/mc.10147)
- Li L, Lee KM, Han W, Choi JY, Lee JY, Kang GH, Park SK, Noh DY, Yoo KY & Kang D 2010 Estrogen and progesterone receptor status affect genome-wide DNA methylation profile in breast cancer. *Human Molecular Genetics* **19** 4273–4277. (doi:10.1093/hmg/ddq351)
- Lillycrop KA 2011 Effect of maternal diet on the epigenome: implications for human metabolic disease. *Proceedings of the Nutrition Society* **70** 64–72. (doi:10.1017/S0029665110004027)
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM *et al.* 2009 Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* **462** 315–322. (doi:10.1038/nature08514)
- Martinez-Iglesias O, Garcia-Silva S, Tenbaum SP, Regadera J, Larcher F, Paramio JM, Vennstrom B & Aranda A 2009 Thyroid hormone receptor beta1 acts as a potent suppressor of tumor invasiveness and metastasis. *Cancer Research* **69** 501–509. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2198)
- McCarthy MM 2008 Estradiol and the developing brain. *Physiological Reviews* **88** 91–124. (doi:10.1152/physrev.00010.2007)
- McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonte B, Szyf M, Turecki G & Meaney MJ 2009 Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature Neuroscience* **12** 342–348. (doi:10.1038/nn.2270)
- Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M & Gannon F 2003 Estrogen receptor- $\alpha$  directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115** 751–763. (doi:10.1016/S0092-8674(03)00934-6)
- Metivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Peron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, Ibberson D, Barath P, Demay F, Reid G *et al.* 2008 Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* **452** 45–50. (doi:10.1038/nature06544)
- Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC & Leonhardt H 2005 Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *PNAS* **102** 8905–8909. (doi:10.1073/pnas.0501034102)
- Murayama A, Kim MS, Yanagisawa J, Takeyama K & Kato S 2004 Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO Journal* **23** 1598–1608. (doi:10.1038/sj.emboj.7600157)



- Murgatroyd C, Patchev AV, Wu Y, Micale V, Bockmuhl Y, Fischer D, Holsboer F, Wotjak CT, Almeida OF & Spengler D 2009 Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nature Neuroscience* **12** 1559–1566. (doi:10.1038/nn.2436)
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN & Bird A 1998 Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393** 386–389. (doi:10.1038/30764)
- Newbold RR, Hanson RB, Jefferson WN, Bullock BC, Haseman J & McLachlan JA 1998 Increased tumors but uncompromised fertility in the female descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. *Carcinogenesis* **19** 1655–1663. (doi:10.1093/carcin/19.9.1655)
- Newbold RR, Padilla-Banks E & Jefferson WN 2006 Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology* **147** S11–S17. (doi:10.1210/en.2005-1164)
- Newell-Price J 2003 Proopiomelanocortin gene expression and DNA methylation: implications for Cushing's syndrome and beyond. *Journal of Endocrinology* **177** 365–372. (doi:10.1677/joe.0.1770365)
- Newell-Price J, King P & Clark AJ 2001 The CpG island promoter of the human proopiomelanocortin gene is methylated in nonexpressing normal tissue and tumors and represses expression. *Molecular Endocrinology* **15** 338–348. (doi:10.1210/me.15.2.338)
- Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA & Morris MJ 2010 Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* **467** 963–966. (doi:10.1038/nature09491)
- Ooi SK & Bestor TH 2008 The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* **133** 1145–1148. (doi:10.1016/j.cell.2008.06.009)
- Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD & Simmons RA 2008 Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *Journal of Clinical Investigation* **118** 2316–2324. (doi:10.1172/JCI32011)
- Payer B & Lee JT 2008 X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. *Annual Review of Genetics* **42** 733–772. (doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091711)
- Prins GS 2008 Estrogen imprinting: when your epigenetic memories come back to haunt you. *Endocrinology* **149** 5919–5921. (doi:10.1210/en.2008-1266)
- Rai K, Huggins IJ, James SR, Karpf AR, Jones DA & Cairns BR 2008 DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell* **135** 1201–1212. (doi:10.1016/j.cell.2008.11.042)
- Rai K, Sarkar S, Broadbent TJ, Voas M, Grossmann KF, Nadauld LD, Dehghanizadeh S, Hagos FT, Li Y, Toth RK *et al.* 2010 DNA demethylase activity maintains intestinal cells in an undifferentiated state following loss of APC. *Cell* **142** 930–942. (doi:10.1016/j.cell.2010.08.030)
- Reid G, Gallais R & Metivier R 2009 Marking time: the dynamic role of chromatin and covalent modification in transcription. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41** 155–163. (doi:10.1016/j.biocel.2008.08.028)
- Renner R 2009 Key environmental epigenetics paper challenged. *Environmental Science & Technology* **43** 8009–8010. (doi:10.1021/es902777p)
- Revill K, Dudley KJ, Clayton RN, McNicol AM & Farrell WE 2009 Loss of neuronatin expression is associated with promoter hypermethylation in pituitary adenoma. *Endocrine-Related Cancer* **16** 537–548. (doi:10.1677/ERC-09-0008)
- Robertson KD 2005 DNA methylation and human disease. *Nature Reviews. Genetics* **6** 597–610. (doi:10.1038/nrg1655)
- Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL & Wolffe AP 2000 DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nature Genetics* **25** 338–342. (doi:10.1038/77124)
- Rountree MR, Bachman KE & Baylin SB 2000 DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nature Genetics* **25** 269–277. (doi:10.1038/77023)
- Sandovici I, Smith NH, Nitert MD, Ackers-Johnson M, Uribe-Lewis S, Ito Y, Jones RH, Marquez VE, Cairns W, Tadayon M *et al.* 2011 Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter–enhancer interaction at the *Hnf4a* gene in rat pancreatic islets. *PNAS* **108** 5449–5454. (doi:10.1073/pnas.1019007108)
- Sasaki M, Kaneuchi M, Fujimoto S, Tanaka Y & Dahiya R 2003 Hypermethylation can selectively silence multiple promoters of steroid receptors in cancers. *Molecular and Cellular Endocrinology* **202** 201–207. (doi:10.1016/S0303-7207(03)00084-4)
- Schmitt AM, Schmid S, Rudolph T, Anlauf M, Prinz C, Kloppel G, Moch H, Heitz PU, Komminoth P & Perren A 2009 VHL inactivation is an important pathway for the development of malignant sporadic pancreatic endocrine tumors. *Endocrine-Related Cancer* **16** 1219–1227. (doi:10.1677/ERC-08-0297)
- Schwarz JM, Nugent BM & McCarthy MM 2010 Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span. *Endocrinology* **151** 4871–4881. (doi:10.1210/en.2010-0142)
- Shafiei F, Rahnama F, Pawella L, Mitchell MD, Gluckman PD & Lobie PE 2008 DNMT3A and DNMT3B mediate autocrine hGH repression of plakoglobin gene transcription and consequent phenotypic conversion of mammary carcinoma cells. *Oncogene* **27** 2602–2612. (doi:10.1038/sj.onc.1210917)
- Simpson DJ, Hibberts NA, McNicol AM, Clayton RN & Farrell WE 2000 Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island. *Cancer Research* **60** 1211–1216.
- Skinner MK, Manikkam M & Guerrero-Bosagna C 2010 Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **21** 214–222. (doi:10.1016/j.tem.2009.12.007)
- Stein CE, Fall CH, Kumaran K, Osmond C, Cox V & Barker DJ 1996 Fetal growth and coronary heart disease in south India. *Lancet* **348** 1269–1273. (doi:10.1016/S0140-6736(96)04547-3)
- Stidley CA, Picchi MA, Leng S, Willink R, Crowell RE, Flores KG, Kang H, Byers T, Gilliland FD & Belinsky SA 2010 Multivitamins, folate, and green vegetables protect against gene promoter methylation in the aerodigestive tract of smokers. *Cancer Research* **70** 569–574. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3410)
- Sui L & Li BM 2010 Effects of perinatal hypothyroidism on regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor gene expression in rat hippocampus: role of DNA methylation and histone acetylation. *Steroids* **75** 988–997. (doi:10.1016/j.steroids.2010.06.005)
- Tang WY, Newbold R, Mardilovich K, Jefferson W, Cheng RY, Medvedovic M & Ho SM 2008 Persistent hypomethylation in the promoter of nucleosomal binding protein 1 (Nsbp1) correlates with overexpression of Nsbp1 in mouse uteri neonatally exposed to diethylstilbestrol or genistein. *Endocrinology* **149** 5922–5931. (doi:10.1210/en.2008-0682)
- Thompson RF, Fazzari MJ, Niu H, Barzilay N, Simmons RA & Grealley JM 2010 Experimental intrauterine growth restriction induces alterations in DNA methylation and gene expression in pancreatic islets of rats. *Journal of Biological Chemistry* **285** 15111–15118. (doi:10.1074/jbc.M109.095133)
- Turner BM 1998 Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence. *Cellular and Molecular Life Sciences* **54** 21–31. (doi:10.1007/s000180050122)
- Waddington C 1942 The epigenotype. *Endeavour* **1** 18–20.
- Weaver IC, D'Alessio AC, Brown SE, Hellstrom IC, Dymov S, Sharma S, Szyf M & Meaney MJ 2007 The transcription factor nerve growth factor-inducible protein 1 mediates epigenetic programming:

- altering epigenetic marks by immediate-early genes. *Journal of Neuroscience* **27** 1756–1768. (doi:10.1523/JNEUROSCI.4164-06.2007)
- Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD & Dietz WH 1997 Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *New England Journal of Medicine* **337** 869–873. (doi:10.1056/NEJM199709253371301)
- Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G & Guo SW 2007 Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferases DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis. *Fertility and Sterility* **87** 24–32. (doi:10.1016/j.fertnstert.2006.05.077)
- Xing M 2007 Gene methylation in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* **148** 948–953. (doi:10.1210/en.2006-0927)
- Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Maekawa R, Taniguchi K, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H & Sugino N 2009 DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and estrogen. *Human Reproduction* **24** 1126–1132. (doi:10.1093/humrep/dep015)
- Yoon HG, Chan DW, Reynolds AB, Qin J & Wong J 2003 N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Molecular Cell* **12** 723–734. (doi:10.1016/j.molcel.2003.08.008)
- Zhao Z, Fan L & Frick KM 2010 Epigenetic alterations regulate estradiol-induced enhancement of memory consolidation. *PNAS* **107** 5605–5610. (doi:10.1073/pnas.0910578107)

Received in final form 6 July 2011

Accepted 28 July 2011

Made available online as an Accepted Preprint 29 July 2011